

Aus der Robert-Rössle-Klinik, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie,
Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin,
Campus Buch

dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin,
Campus Benjamin Franklin

und dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch

Dissertation

Untersuchungen zur Molekularpathologie des Hodgkin-Lymphoms - Klonierung des I kappa B epsilon Gens und Mutationsanalyse in Einzelzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von Sebastian Theurich
aus Haan

Gutachter: 1. Professor Dr. med. Bernd Dörken
 2. Professor Dr.med. L. Kanz
 3. Professor Dr. med. R. Andreesen

Datum der Promotion: 7. Juli 2006

Meinen Eltern, Sabine und Henning Theurich,
und meiner Großmutter, Gisela Pfeiffer.

ABSTRACT

The pathogenesis of Hodgkin-Lymphoma (HL) is still unclear. Previous investigations have demonstrated constitutive nuclear activity of the transcription factor NF kappa B (NF- κ B) in Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) cells as an important prerequisite in protecting these cells from apoptosis. As a molecular mechanism leading to constitutive NF- κ B activity in HRS cells, mutations of the NF- κ B inhibitor I kappa B alpha (I κ B α) have recently been identified in classical (c) HL-derived cell lines in a patient with cHL. In this work, the NF- κ B inhibitor I kappa B epsilon (I κ B ϵ) has been analysed for somatic mutations in the same group of six patients already studied for I κ B α mutations, as well as in cHL-derived cell lines. In the HRS cells of one patient, a hemizygous mutation affecting the 5'-splicing site of intron 1 of the I κ B ϵ gene was found, most likely leading to misspliced mRNA products. Other work of our group showed a hemizygous frame-shift mutation of the I κ B ϵ gene in one cHL-derived cell line (L428), generating a pre-terminal stop codon resulting in a severely truncated protein. These results, in combination with recently described I κ B α mutations, indicate that defective NF- κ B inhibitors appear more frequent than previously thought and might explain the constitutive nuclear activity of NF- κ B in a significant proportion of cHL cases.

Keywords: Hodgkin/Reed-Sternberg cells , NF kappa B , I kappa B epsilon mutations

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Hodgkin-Lymphom	1
1.2	Entwicklung und Eigenschaften von H/RS Zellen	1
1.2.1	H/RS Zellen stammen von Lymphozyten des Keimzentrums ab	2
1.2.2	H/RS Zellen entgehen einer Selektion im Keimzentrum	2
1.3	Das NF-κB System und seine Bedeutung für das Hodgkin-Lymphom	3
1.3.1	Die Regulation von NF- κ B	3
1.3.2	I κ B Proteine – I κ B- α , I κ B- β und I κ B- ϵ	5
1.3.3	Konstitutive Aktivität von NF- κ B in H/RS Zellen	6
1.3.4	Defekte der NF- κ B Regulation	7
1.3.5	Mögliche Bedeutung von I κ B- ϵ für die NF- κ B Aktivität in H/RS Zellen	7
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	8
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Material	9
2.1.1	Zelllinie (L1236)	9
2.1.2	Bakterien	9
2.1.3	Gewebeproben	9
2.1.4	DNA Bibliothek des Humangenoms	10
2.1.5	Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial	11
2.2	Methoden - Klonierung und chromosomale Kartierung des IκB-ϵ Gens	14
2.2.1	Zellkultur	14
2.2.2	RNA Präparation	15
2.2.3	Polymerasekettenreaktionen - Optimierungen und Kontrollen	15
2.2.4	Synthese komplementärer DNA (cDNA)	16
2.2.5	Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)	16
2.2.6	Gelelektrophorese	17
2.2.7	Gelextraktion	17
2.2.8	Klonierung von PCR-Produkten	17
2.2.8.1	Ligation	17
2.2.8.2	Transformation und Klonierung	18
2.2.8.3	Präparation klonierter vektorieller DNA aus E. coli Bakterien	19

2.2.9	Klonierung und Sequenzierung des I κ B- ϵ Gens aus der humanen DNA Bibliothek	19
2.2.9.1	Screening der humanen DNA Bibliothek RPCI 1, 3-5	19
2.2.9.2	Präparation von PAC DNA aus E. coli	20
2.2.9.3	Primerwalking	21
2.2.9.4	Sequenzierung des PAC Klons	22
2.2.10	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	22
2.3	Methoden - Analyse von Einzelzellen aus Primärmaterial	24
2.3.1	Immunfärbung der Biopsate	24
2.3.2	Auswahlkriterien der Zellen	25
2.3.3	Extraktion von Einzelzellen aus dem Gewebeverband	25
2.3.4	Multiplex- und Seminested-PCR	26
2.3.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	28
2.3.6	Sequenzierung der Amplifikate aus Einzelzellen	29
2.4	Verwendete Computerprogramme	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Struktur und chromosomale Lage des IκB-ϵ Gens	30
3.1.1	Klonierung und Sequenzierung	30
3.1.2	Die Struktur des I κ B- ϵ Gens	31
3.1.3	Unterschiede zwischen genomischer und mRNA Sequenz	32
3.1.4	Nicht translatierte Region (UTR)	32
3.1.5	Chromosomale Lokalisierung mittels FISH	35
3.2	Untersuchung des IκB-ϵ Gens in Hodgkin/ Reed-Sternberg Zellen	36
3.2.1	Etablierung der PCR-Methode zur Untersuchung von Einzelzellen	36
3.2.2	Analyse von Einzelzellen	38
4	DISKUSSION	41
4.1	Bedeutung der Apoptoseresistenz für H/RS Zellen	41
4.2	Mögliche Ursachen für konstitutiv aktiviertes NF-κB	42
4.3	Gründe für die Untersuchung des IκB-ϵ Gens	43
4.4	Diskussion der Methodik	43

4.5	Unterschiede der klonierten DNA zur bisher bekannten IκB-ε Sequenz	44
4.6	Das IκB-ε Gen im Vergleich mit IκB-α	45
4.7	Chromosomale Lage des IκB-ε Gens	46
4.7.1	Mögliche Bedeutung Genlokus 6p21 für eine Neoplasieentwicklung	46
4.8	Bedeutung einer Epstein-Barr-Virus Infektion im untersuchten Material	48
4.9	Mutationen des IκB-ε Gens in Einzelzellen	48
4.9.1	Mögliche funktionelle Auswirkung der Mutation (1253G→ A)	49
4.9.2	Diskussion der Bedeutung eines IκB-ε Defekts in H/RS Zellen	51
4.10	Fazit und Ausblick	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	54
6	LITERATURVERZEICHNIS	55
7	PUBLIKATIONSLISTE	66
8	DANKSAGUNG	67
9	LEBENS LAUF	68
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	69

1 EINLEITUNG

1.1 DAS HODGKIN-LYMPHOM

1832 berichtete der englische Arzt Thomas Hodgkin in seinem Artikel „On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen“ von sieben Sektionsfällen, bei denen ihm stark vergrößerte, indurierte Lymphknoten und eine Splenomegalie aufgefallen waren. (Hodgkin, T. 1832 Med.-Chir. Trans 17: 68) Dies war die Erstbeschreibung einer Erkrankung, die zunächst als Morbus Hodgkin und später dann als Hodgkin-Lymphom bezeichnet wurde. Wie von Hodgkin beschrieben, gehört zur Klinik des Lymphoms eine ausgeprägte nicht schmerzhaftes Lymphadenopathie, die insbesondere zervikal, supraklavikulär und axillär lokalisiert ist. Außerdem können weitere unspezifische klinische Merkmale als sogenannte B Symptome hinzu treten. Diese umfassen Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fieber – in manchen Fällen undulierend als sogenanntes Pel-Ebstein-Fieber.

Erst viele Jahre nach der makroskopischen Beschreibung durch Hodgkin wurden die typischen mono- und multinukleären Riesenzellen von Reed und Sternberg entdeckt. Mononukleäre Riesenzellen werden als Hodgkin, multinukleäre als Reed-Sternberg Zellen bezeichnet. Hodgkin und Reed-Sternberg (H/RS) Zellen stellen die charakteristischen und Diagnose bestimmenden Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms dar, machen aber nur 1–2% der gesamten Tumorzellmasse aus. Die Hauptmatrix des Lymphomgewebes wird dagegen von reaktiven Lymphozyten, Epitheloidzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten gebildet. [1, 2]

In der WHO- Klassifikation maligner Lymphome von 2001 wird das selten vorkommende (ca. 2-3%) Lymphozyten prädominante Hodgkin-Lymphom (LPHL) als eigene Entität vom klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL) abgegrenzt. Letzteres teilt man in die vier bekannten Subtypen auf: Nodulär-sklerosierend (ca. 60-70%), Mischtyp (ca. 25%), lymphozytenarmer Typ (ca. 1%) und lymphozytenreicher Typ (ca. 3%). [3, 4]

1.2 ENTWICKLUNG UND EIGENSCHAFTEN VON H/RS ZELLEN

Der histologische Nachweis von H/RS Zellen bildet die Grundlage für die Diagnosestellung eines Hodgkin-Lymphoms. In der klinischen Routine wurde dies durch den Nachweis des CD30 Moleküls erleichtert, welches an der Oberfläche von H/RS Zellen meist exprimiert wird. Mit immunhistologischen Methoden lassen sich so die seltenen Tumorzellen darstellen. [5, 6] Aufgrund ihres extrem geringen Vorkommens eröffnete aber erst die Entwicklung hochsensitiver Techniken, wie die der Einzelzell-PCR mit mikrodisezierten Tumorzellen, den Zugang zum näheren Verständnis zur Herkunft von H/RS Zellen und den dahinter stehenden pathophysiologischen Mechanismen. [7]

1.2.1 H/RS Zellen stammen von Lymphozyten des Keimzentrums ab

Der klonale Ursprung der H/RS Zellen konnte erst vor kurzem von Post-Keimzentrums B-Lymphozyten abgeleitet werden, was die meisten klassischen Hodgkin-Lymphomfälle betrifft. [8, 9, 10]

In seltenen Fällen (ca. 1 - 2%) stammen H/RS Zellen klonal von T-Zellen ab. [11, 12] Darüber hinaus zeigen phylogenetische Untersuchungen, dass das Hodgkin-Lymphom mit der Evolution von lymphatischen Keimzentren bei Säugetieren verbunden ist und betonen damit die Bedeutung dieser Strukturen für die Pathogenese des Lymphoms. [13]

1.2.2 H/RS Zellen entgehen einer Selektion im Keimzentrum

In den hellen und dunklen Zonen der Keimzentren sekundärer Lymphfollikel reifen B-Lymphozyten im Rahmen einer Immunantwort aus und erlangen dort die Fähigkeit, die Affinität der produzierten Immunglobuline zu steigern. Durch Hypermutation entstehen dabei in den rearrangierten Genen der Immunglobulinketten vielfältige somatische Mutationen, die die Affinität der Antikörper zum Antigen erhöhen. Lymphozyten, die hoch affine und intakte Antikörper produzieren, werden durch Überlebenssignale vor dem programmierten Zelltod bewahrt. Es können aber auch Lymphozyten entstehen, die defekte, niedrig affine oder autoreaktive Immunglobuline exprimieren. Normalerweise werden diese Zellen dann durch FAS/CD95 gesteuerte Apoptose eliminiert. [14] Für H/RS Zellen konnte gezeigt werden, dass die FAS/CD95 gesteuerte Apoptose einerseits durch Mutationen des FAS Gens beeinträchtigt sein kann, andererseits auch durch eine gesteigerte Aktivität des „cellular FADD-like interleukin 1beta-converting enzyme-inhibitory protein“ (c-FLIP) gehemmt wird. [15, 16, 17]

H/RS Zellen haben rearrangierte Immunglobulin Gene, in denen als Zeichen der Hypermutation somatische Mutationen nachweisbar sind. Eine Expression von Immunglobulinen an der Zelloberfläche fehlt H/RS Zellen jedoch. [18] Defekte im Transkriptionsprozess, dysregulierte Transkriptionsfaktoren, insbesondere Bob.1/OBF.1 und Oct2, und epigenetisches Silencing werden für die fehlende Immunglobulinexpression verantwortlich gemacht. [19, 20, 21, 22] Trotz dieser Tatsache entgehen H/RS Zellen der apoptotischen Selektion.

Ein weiteres wichtiges Molekül für die Tumorigenese des cHL stellt der Transkriptionsfaktor NOTCH1 dar, der im Wesentlichen für die Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen in die T- oder B-Zellreihe verantwortlich ist. NOTCH1 ist in H/RS Zellen des cHL stark exprimiert und wird durch die Interaktion mit dem dazugehörigen Liganden, Jagged1, welcher von umliegenden malignen und nicht malignen Zellen exprimiert wird, aktiviert. [23] Durch diese Interaktion werden sowohl Proliferation als auch Apoptoseresistenz der H/RS Zellen massiv erhöht.

1.3 DAS NF- κ B SYSTEM UND SEINE BEDEUTUNG FÜR DAS HODGKIN-LYMPHOM

Neben der Notwendigkeit, der Selektion im Keimzentrum zu entgehen, ist es auch für das weitere Überleben von H/RS Zellen unabdingbar, in einem Mikromilieu zu existieren, das sie von regulatorischen Einflüssen der Umgebung unabhängig macht. Solche Eigenschaften umfaßt das System um den „nuclear factor for the kappa chain in B cells“ (NF- κ B), das seit einiger Zeit im Mittelpunkt des Interesses steht. Als ein gemeinsames Merkmal von H/RS Zellen beschrieben Bargou et al. 1996 erstmals eine konstitutive nukleäre Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in sieben Hodgkin Zelllinien und in primären H/RS Zellen eines Patienten. [24] Dies hat nicht zuletzt deswegen große Relevanz, weil NF- κ B bei vielen Signalwegen mit beteiligt ist und sowohl in die FAS induzierte Apoptose, als auch in die Regulation von NOTCH eingreift. [25, 26]

1.3.1 Die Regulation von NF- κ B

Ursprünglich wurde NF- κ B als Transkriptionsfaktor in B-Zellen gefunden, der die Synthese der Immunglobulin Leichtkette κ reguliert. Bald zeigte sich jedoch, dass NF- κ B in fast allen kernhaltigen Geweben zu finden ist und eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, bei inflammatorischen Antworten und bei der Zellteilung spielt. [27, 28]

NF- κ B bindet an seine DNA Zielsequenzen als Dimer, welches als Homo- oder Heterodimer aus den Untereinheiten p65(RelA), p50, p52, c-Rel oder RelB zusammengesetzt ist. Die ursprünglich entdeckte NF- κ B Form in B Zellen besteht aus dem Heterodimer p50/p65. Jede dieser Untereinheiten trägt aminoterminal eine sogenannte Rel-Homologie Domäne (RHD), die für die Dimerisierung wichtig ist und auch DNA Bindungsstellen, sowie eine Kernlokalisationssequenz (NLS) enthält. Physiologischerweise wird NF- κ B im nicht aktivierten Zustand von Proteinen der I kappa B Familie (I κ B) im Zytoplasma zurückgehalten, von denen I κ B- α , I κ B- β und I κ B- ϵ als die drei wichtigsten gelten. Strukturell weisen I κ B Proteine eine wichtige gemeinsame Domäne auf: Sechs so genannte Ankyrin Repeats einer Länge von 33 Aminosäuren. Über diese Ankyrin Repeats binden I κ B Proteine an die RHD von NF- κ B, verdecken die NLS und halten NF- κ B im Zytoplasma zurück. Als Antwort auf ein rezeptorvermitteltes Signal, oder aber auch durch unspezifische Stimuli wie zum Beispiel elektromagnetische Strahlung, kommt es zur Aktivierung von NF- κ B. Dazu werden I κ B Moleküle an bestimmten Serinen durch den I κ B Kinase Komplex (IKK) phosphoryliert. Die sich anschließende Ubiquitinierung hat den Abbau der I κ Bs durch das Proteasom zur Folge, so dass nun NF- κ B frei im Zytoplasma vorliegt und in den Zellkern gelangen kann (Abbildung 1). Der gerichtete nukleäre Transport wird durch die Kernlokalisationssequenz (NLS) gesteuert.

Im Zellkern bindet NF- κ B als Transkriptionsfaktor an seine Zielsequenzen, wodurch ein weites Spektrum von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Akute Phase Proteinen und Apoptoseinhibitoren reguliert wird. Als Beispiele seien IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , Eotaxin, ICAM, VCAM, SAA, und iNOS genannt.

[28]

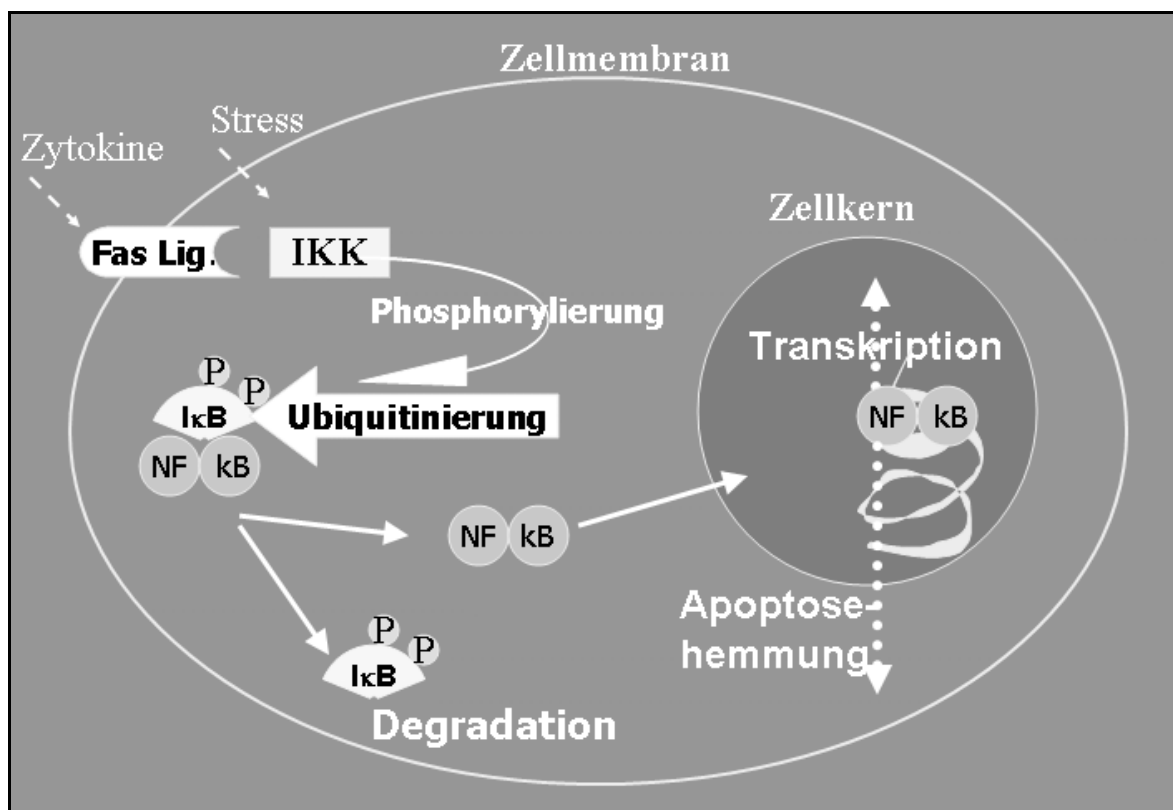


Abbildung 1: Stark vereinfachte Darstellung der NF- κ B Signaltransduktion. Eine Aktivierung kann unter anderem spezifisch mittels TNF α über den FAS Ligandenrezeptor (FAS Lig.) oder unspezifisch (Stress) initiiert werden. Der I κ B Kinase Komplex (IKK) phosphoryliert I κ B Moleküle, die daraufhin degradiert werden. NF- κ B transloziert in den Zellkern und initiiert die Transkription einer großen Anzahl von Zytokinen.

1.3.2 IκB Proteine – IκB-α, IκB-β und IκB-ε

Zehn verschiedene IκB Isoformen konnten bisher nachgewiesen werden, von denen jedoch nur IκB-α, IκB-β und IκB-ε ständig exprimiert werden. Die anderen Isoformen werden auf zellulären Streß reaktiv induziert, entstehen als Spaltprodukte aus Präkursoren oder durch alternatives Splicing. [29, 30]

IκB-α [31], IκB-β [32] und IκB-ε [33] unterscheiden sich unter anderem durch die Kinetik, mit der sie mit NF-κB interagieren und in ihrer subzellulären Lokalisation. IκB-α wurde als erstes IκB Protein kloniert. Es wird schnell exprimiert und degradiert, und ist in der Lage, NF-κB sowohl im Zytosol zurückzuhalten, als auch im Zellkern dessen Aktivität zu hemmen. [29] IκB-β, das wie IκB-α mit denselben NF-κB Untereinheiten interagiert, und IκB-ε werden langsamer degradiert.

IκB-ε ist vorwiegend im Zytosol lokalisiert, wo es hauptsächlich an p65 und cRel bindet (Tabelle 1). [33]Die stärkste Expression von IκB-ε mRNA wurde in Milzgewebe, in der Lunge und im Hoden gefunden. [34]Innerhalb der lymphatischen Zellpopulation zeigten Li et al. eine hauptsächlichliche Expression des IκB-ε Wildtyps in B-Zellen, insbesondere transformierten B-Zellen. Diskrepanterweise war jedoch in Mäusen mit einem IκB-ε Knockout eine Subpopulation von T-Zellen um 50% reduziert. [35]IκB-ε hat im Gegensatz zu IκB-α eine langsamere Kinetik, was sich in der geringeren Geschwindigkeit, mit der NF-κB gehemmt wird, zeigt. Ebenso wird es langsamer proteosomal degradiert und reinduziert. [33, 36]

Tabelle 1: Übersicht der klassischen IκB Proteine, die konstitutiv exprimiert werden. Der Genlokus von humanem IκB-ε war zu Beginn der Untersuchung unbekannt.

IκB	Protein (kDa)	Genlokus	NF-κB Interaktion	Kinetik
alpha	37	14q13	p50,p52,p65,cRel	schnell, Zytosol und Zellkern
beta	43	19q13.1	p50,p52,p65,cRel	langsam, Zytosol und Zellkern
epsilon	45	Unbekannt	p65, cRel	langsam, vorwiegend Zytosol

Ob sich IκB Isoformen in ihrer Funktion komplementär zueinander oder redundant verhalten, ist weiterhin Gegenstand der Forschung und wurde nur zum Teil durch Knockout Experimente bei Mäusen geklärt. IκB-α defiziente Mäuseembryonen entwickelten sich bis zur Geburt normal, zeigten jedoch postnatal schwere Dermatitiden und Immundefekte, die nach einer Woche letal endeten. NF-κB war bei diesen Tieren in lymphatischen Zellen stark aktiviert, nicht jedoch in Fibroblasten. Für diese Diskrepanz wurde eine stärkere Expression von IκB-β in Fibroblasten

verantwortlich gemacht, die die fehlende I κ B- α Wirkung kompensieren könnte. [37, 38] Gleichsinnig scheint in diesen Fibroblasten auch I κ B- ε kompensatorisch erhöht zu sein. [33] Ein Knockout von murinem I κ B- ε zeigte einen normalen Phänotyp. In diesen Knockout Mäusen wurde jedoch neben konstitutiv erhöhten Konzentrationen von IgM und IgG1 auch eine erhöhte mRNA Expression für IL-1 α , IL-1 β , IL-Ra und IL-6 gemessen. Außerdem war eine Subpopulation von T-Lymphozyten (CD44- / CD25+) um 50% reduziert. [35]

Die I κ B Isoformen zeigen in vivo demnach sehr unterschiedliche Funktionen, die sich teilweise auch zu widersprechen scheinen. Somit ist eine Antwort auf die Frage, ob sich I κ B Proteine komplementär oder redundant zueinander verhalten, nach jetzigem Kenntnisstand nicht möglich. Es scheint daher notwendig, die Rolle der I κ B Moleküle zelltypspezifisch und situativ zu bestimmen.

1.3.3 Konstitutive Aktivität von NF- κ B in H/RS Zellen

NF- κ B wurde schon bei einer Reihe von Malignomen für Tumorprogression und Chemotherapieresistenz verantwortlich gemacht. [39, 40] Beispielsweise wurde mittels adenoviral eingebrachtem I κ B- α in murine Fibrosarkomzellen eine übermäßige NF- κ B Aktivität in vivo gehemmt und die Chemosensibilität wieder hergestellt, was zur Tumorregression führte. [41]

Physiologischerweise ist in den meisten Zelltypen bis auf die Ausnahme von bestimmten Neuronen [42] eine nukleäre NF- κ B Aktivität nicht nachzuweisen und tritt sonst nur kurzzeitig als Antwort auf einen Stimulus auf. [28] In aktivierten B-Lymphozyten finden sich NF- κ B Heterodimere, die sich aus p50 oder p52 und c-Rel oder RelB zusammensetzen. H/RS Zellen hingegen zeigen vor allem eine konstitutive Aktivität des Heterodimers p50/p65. [24] Im Gegensatz zu anderen Zellenlinien, lymphatischen und nicht lymphatischen Ursprungs, war die Proliferation der H/RS Zellen von aktiviertem NF- κ B abhängig. Wurden H/RS Zellen in Mäuse mit schwerem Immundefekt (SCID) transplantiert, konnten sie im Wachstum gehemmt und für Apoptose sensibilisiert werden, wenn die NF- κ B Aktivierung durch einen in die Zellen transfizierten dominant negativen Inhibitor (I κ B- α) blockiert wurde. [43] Vor diesem Hintergrund stellt der Nachweis, dass H/RS als gemeinsame Eigenschaft konstitutiv aktives NF- κ B (p50/p65) zeigen, einen wichtigen Schritt für ein tiefer gehendes Verständnis der Pathophysiologie des Hodgkin-Lymphoms dar. [24] Die Kernaktivität von NF- κ B in H/RS Zellen ist neben seiner Restriktion auf die Tumorzellen auch für das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung interessant, da sie sowohl molekulare Basis für die Entzündungssymptomatik, als auch die Eosinophilie und Invasion von weiteren Leukozyten in das befallene Gewebe erklären könnte. [44, 45]

1.3.4 Defekte der NF- κ B Regulation

Als Zielmoleküle, die zu einer unregelmäßigen NF- κ B Aktivierung beitragen könnten, werden vor allem Mitglieder der I κ B Familie, des IKK und weiter aufwärts agierende Regulatoren diskutiert. Eine aberrante Aktivierung der IKK, die zu einer verstärkten Degradation von I κ B führt, wurde beschrieben. [46] In anderen Untersuchungen scheint die konstitutive Aktivität von NF- κ B nicht durch einen Mangel oder eine fehlende Expression von I κ B Molekülen verursacht zu sein.

Vielmehr wurden Mutationen im I κ B- α Gen in den aus Hodgkin Zellen generierten Zelllinien L428 und KM-H2, sowie im Primärmaterial eines Patienten mit cHL gefunden. [47] Diese Mutationen führten zu einem stark verkürzten I κ B- α Protein, das nicht mehr in der Lage war, die Aktivität von NF- κ B zu hemmen. Defekte des I κ B- α Gens wurden in der Folgezeit auch von weiteren Arbeitsgruppen beschrieben. [48, 49]

1.3.5 Mögliche Bedeutung von I κ B- ϵ für die NF- κ B Aktivität in H/RS Zellen

Die bisher gefundenen Defekt der NF- κ B Regulation können eine konstitutive Aktivität in H/RS Zellen nicht hinreichend erklären. Zur Klärung der Frage nach weiteren Störungen war der Inhibitor I κ B- ϵ ein geeigneter Kandidat.

I κ B- ϵ wurde ursprünglich als Inhibitor beschrieben, der besonders die NF- κ B Untereinheiten p65 und cRel zu binden vermag, wohingegen seine Interaktion mit p50 und p52 schwächer scheint. [33] Es wurde jedoch auch beobachtet, dass I κ B- ϵ eine vergleichbare Hemmung der Aktivität des Heterodimers p50/p65 bewirkt wie I κ B- α . [34] Da in H/RS Zellen vorwiegend p50/p65 Komplexe gefunden wurden, ergab sich die Frage nach der Bedeutung von I κ B- ϵ für die deregulierte NF- κ B Aktivität in diesen Tumorzellen. Ein weiterer Grund für die Untersuchung von I κ B- ϵ in H/RS Zellen war die Verteilung der physiologischen Expression dieses Inhibitors in verschiedenen Gewebetypen. I κ B- ϵ wird in B-Lymphozyten exprimiert, am stärksten jedoch in transformierten B-Zellen. Im Gegensatz dazu steht eine sehr viel geringere Expression in T-Lymphozyten. [34] Da H/RS Zellen fast immer von transformierten Keimzentrums B-Zellen abstammen, ergab sich auch hieraus eine Motivation für diese Arbeit.

1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Mit dem Nachweis einer konstitutiven Aktivität von NF- κ B (p50/p65) in H/RS Zellen ist ein zentraler Mechanismus für die Unabhängigkeit der Tumorzellen von externen Stimuli und Apoptoseresistenz entdeckt worden. Die Proteine, die direkt mit NF- κ B in Kontakt treten und dessen Aktivität hemmen, sind die Mitglieder der I κ B Familie. Dadurch stellen sie interessante Kandidaten dar, die bei einem eventuellen Funktionsverlust zu einer Aktivitätssteigerung von NF- κ B führen könnten. Ziel dieser Arbeit war es daher, nach Veränderungen des humanen I κ B- ϵ in primären H/RS Zellen zu suchen, die zu einer Deregulation des I κ B/ NF- κ B Systems beitragen.

Die Analyse von primären H/RS Zellen auf DNA Ebene ist durch die Technik der Einzelzell-PCR möglich geworden. Hierzu ist die Kenntnis der Genstruktur der Zielsequenz Voraussetzung. Zum Zeitpunkt der Experimente waren von I κ B- ϵ nur mRNA und Proteinstruktur bekannt. Daher war der erste Schritt dieser Arbeit die Klonierung des I κ B- ϵ Gens. Um die Frage nach möglichen Pseudogenen zu klären, wurde außerdem der chromosomale Genloкус gesucht. Anschließend sollte eine kombinierte Einzelzell-PCR Methode etabliert werden, die es ermöglicht, das gesamte I κ B- ϵ Gen in primären H/RS Zellen zu analysieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Zelllinie (L1236)

Die Epstein-Barr-Virus (EBV) negative Zelllinie L1236 wurde am Institut für Genetik der Universität Köln aus primären Hodgkin/ Reed-Sternberg Zellen eines Hodgkin-Lymphoms des gemischtzellulären Typs generiert.[50]

2.1.2 Bakterien

Für die Klonierungsexperimente wurde Escherichia coli des Stammes XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) verwendet und nach Herstellerangaben kultiviert. Kompetente E. coli XL1-Blue wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt.[51]

2.1.3 Gewebeproben

Primäre Tumorzellen wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Charité – Campus Benjamin Franklin – zur Verfügung gestellt und stammten allesamt aus Lymphknotenbiopsien, anhand derer die Erstdiagnose eines Hodgkin-Lymphoms gestellt wurde. Daher war das Primärmaterial nicht durch eine Chemotherapie oder Radiatio verändert. Eingeteilt nach der WHO Lymphomklassifikation handelte es sich dabei immer um klassische Hodgkin-Lymphome. Proben dieser Fälle wurden schon zuvor von unserer Arbeitsgruppe auf Veränderungen des I κ B- α Gens untersucht.[47] Nach der operativen Entnahme wurden die Lymphknotenbiopsien sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C aufbewahrt. Von den insgesamt sechs Patienten war die Hälfte weiblichen Geschlechts, die Altersverteilung reichte von 16 bis 33 Jahren, in vier Fällen lag der nodulär sklerosierende Subtyp und in zweien der Mischtyp vor. In einem Fall (Nr. 4) konnte eine EBV-Infektion anhand des „latent membrane proteins“ (LMP) nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Charakteristika der untersuchten Patientenfälle

Fall-Nr.	HL Subtyp	Geschlecht	Alter	LMP-Nachweis
1	Nodulär sklerosierend	W	23	negativ
2	Nodulär sklerosierend	M	33	negativ
3	Nodulär sklerosierend	W	30	negativ
4	Nodulär sklerosierend	W	27	positiv
5	Gemischtzellulär	M	16	negativ
6	Gemischtzellulär	M	22	negativ

2.1.4 DNA Bibliothek des Humangenoms

Es wurde eine Bibliothek humaner DNA vom Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genomprojektes am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin bezogen (Bibliotheknummer: RZPD-Nr. 704; RPCI 1,3-5 human PAC; P. de Jong und P. Ioannou), welche auf folgende Weise hergestellt worden ist:

Das Humangenom, extrahiert aus Leukozyten, wurde durch restriktionsenzymatischen Verdau in ca. 120 kb lange Doppelstränge fragmentiert und in P1-artificial-chromosomes (PAC) kloniert. Als PAC diente der Vektor pCYPAC2 mit einem Resistenzgen gegen Kanamycin zur Selektion.

(Abbildung 2)

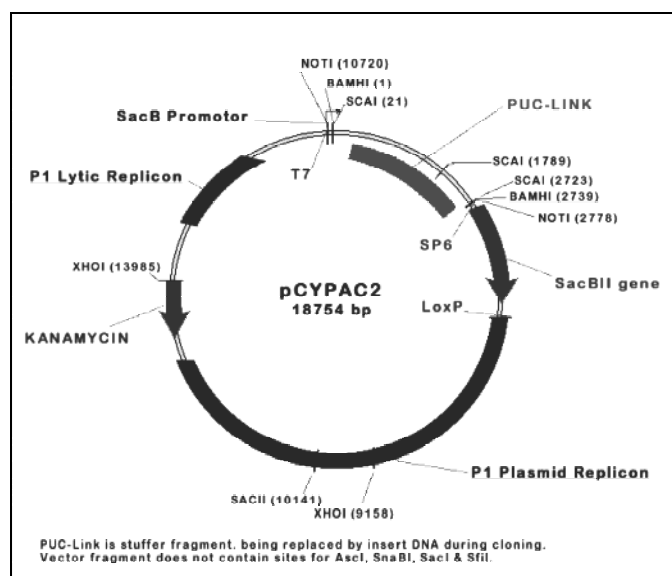


Abbildung 2: Schema des PAC Vektors pCYPAC2; der Abschnitt „PUC-Link“ ist ein Platzhalter und wird beim Klonieren durch den zu ligierenden DNA Strang ersetzt. pCYPAC2 trägt eine Kanamycin Resistenzgen.

Durch unspezifische Restriktion und die Verwendung mehrerer Kopien des menschlichen Genoms entstanden sich überlappende DNA-Bruchstücke unterschiedlicher Länge, die entweder nur Teile, oder aber die vollständige Sequenz einer Zielregion enthalten konnten. Das menschliche Genom ist in dieser Bibliothek ungefähr drei bis sechsfach vorhanden. Nach der Transformation der fragmenttragenden PAC Vektoren in *E. coli* Bakterien des Stammes DH10B, wurden die Klone auf kanamycinhaltigen Nährböden selektiert. Die Vektor-DNA eines Klons wurde per Dot-Blot-Verfahren in einem Koordinatensystem auf Nylonfilter aufgetragen, welche sich zur Hybridisierung mit DNA-Proben eignen. Eine solche Hybridisierung wurde am Ressourcen Zentrum des Max-Planck-Institutes durchgeführt. (www.rzpd.de)

2.1.5 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Geräte	
Elektrophoresekammer	Sub-Cell, BioRad BRD
Fotodokumentation	Drucker, Mitsubishi Japan
Fotokamera	WV-GI 700, Panasonic Japan
Glasküvetten	QS 1000, Hellma BRD
Mikrokapillaren	GD-1, Narishige Japan
Mikromanipulatoren	PC-10 und PB-7, Narishige Japan
Mikropipetten	Reference, Eppendorf BRD
Netzgerät	St 606T, GibcoBRL USA
PCR-Reaktionsgefäße	MicroAmp 0,2 ml, Perkin Elmer USA
Photometer	8452A, Hewlett Packard USA
Plastikküvetten	No. 67754, Sarstedt
Sequenzierungsautomat	310 und 377 Genetic Analyser, ABI Prism USA
Serologische Pipetten	Becton Dickinson Labware USA
Sterile Arbeitsbank	Microflow Biological Cabinet, Nunc Dänemark
Thermocycler	DNA Engine PTC-200, MJ Research
Thermocycler	Gene Amp 9600, Perkin Elmer USA
Umkehrmikroskop	Diaphot 300, Nikon Japan
UV-Illuminator	GelDoc 2000, Biohead Laboratories USA
Wärmeschrank	Function Line, Heraeus Instruments BRD
Zellkulturflaschen	Nunclon Surface, Nunc Dänemark

Kits

cDNA Synthese	First Strand Synth. Kit, Roche Mannh. BRD
DNA Extraktion	QIAamp DNA Mini, Quiagen Hilden
Gelextraktion	QIAex, Quiagen Hilden
PCR-Aufreinigung	QIAquick PCR Purification, Quiagen Hilden
RNA Extraktion	RNeasy Mini Kit, Quiagen Hilden
Sequenzierung	BigDye ABI Prism, Perkin Elmer USA
PAC DNA Aufreinigung	Nucleobond AX PC-Kit 2000, Macherey & Nagel

Chemikalien und Lösungen

Agar Agar	DIFCO, Hamburg
Agarose	Ultrapure Agarose, Gibco BRL, Karlsruhe
Antikörper CD30 (murin, monoklonal)	Institut für Pathologie, UKBF Charité Berlin
Aqua dest.	Delta Pharma und Boehr. Mannh.
Bacto-Agar, Bacto-Tryptone	DIFCO, Hamburg
Desoxyribonukleinsäuren (dNTP)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
DNA fraktioniert	Cot-1, BRL Life Technologies USA
DNA Größenmaßstab (1 kb)	1 kb Ladder, Invitrogen
DNA Größenmaßstab (100 bp)	100 bp Ladder, Fermentas, Lettland
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Seromed Berlin
Glasmilch	Quiagen Hilden
Hämalaun	Institut für Pathologie, Charité Berlin CBB
Heringsperma DNA	Roche Mannheim
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	PE Applied Biosystems, USA
Neufuchsin	Sigma, München
Oligonukleotide; HPLC gereinigt	Tib Mol, Berlin und BioTez, Berlin
PBS Puffer	PBS Dulbeccos, Gibco Karlsruhe

Chemikalien und Lösungen

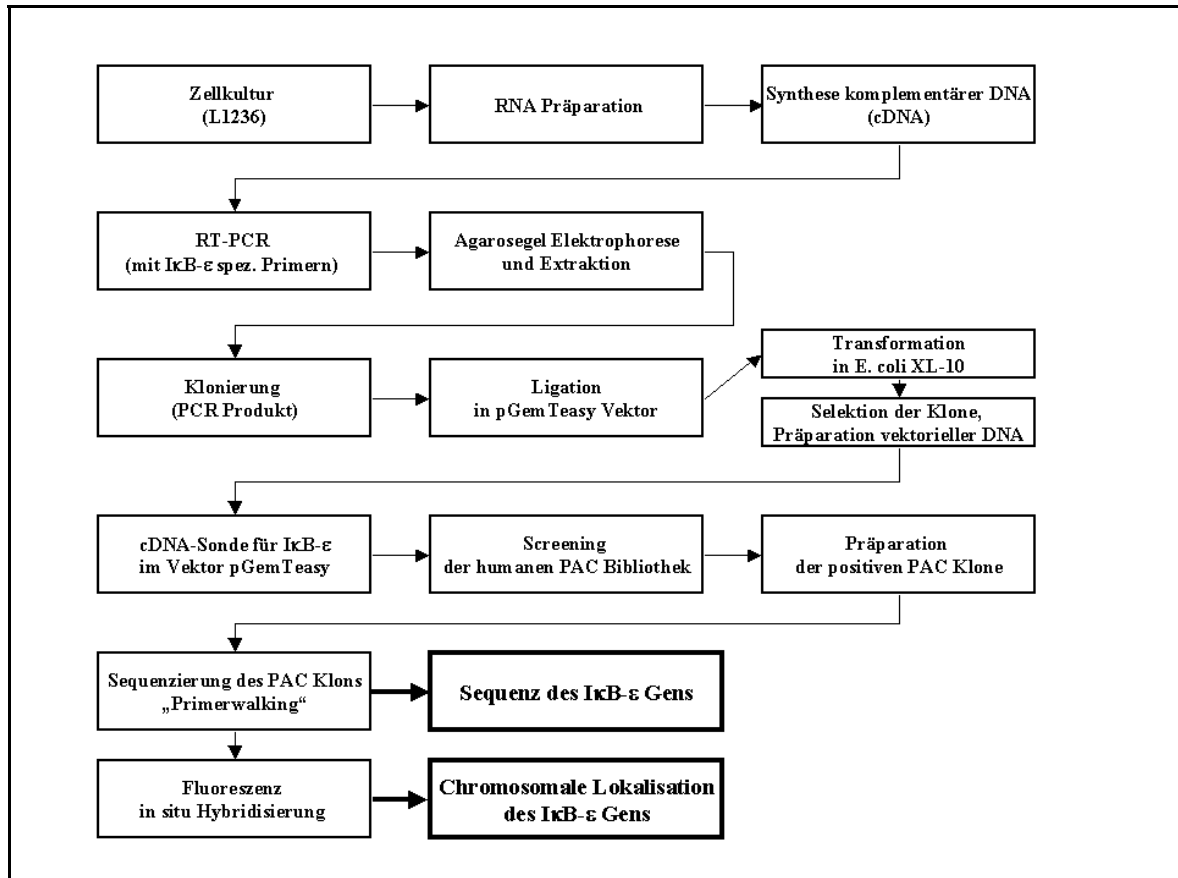
PCR Puffer	Gold Buffer II, Perkin Elmer USA
Penicillin; Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Polymer für die Sequenzierung	POP-4, ABI Prism, Perkin Elmer USA
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, Lettland
Taq Polymerase	Taq Gold, Perkin Elmer USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	Roth, Karlsruhe
TSR Puffer	ABI Prism, Perkin Elmer, USA
X-Gal	Gibco BRL, Karlsruhe
Zellkulturmedium RPMI 1640	Seromed Berlin

Lösungen und Puffer

Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
20 x TBE Puffer	1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA
50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer	2 M Tris-Base, 1 M Na-Acetat, 50 mM EDTA, pH 7,2
Luria-Bertani (LB)-Nährlösung	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl
Luria-Bertani (LB)-Platten	10g Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl, 15g/l Agar, H ₂ O bidest. zu 1l
10 x Tris-EDTA-Lösung, pH 8,5	100 mM Tris-Cl (pH 8,5), 10mM EDTA (pH 8,5)

2.2 METHODEN - KLONIERUNG UND CHROMOSOMALE KARTIERUNG DES $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ GENS

Alle allgemeinen molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. durchgeführt.[51] Das Flussdiagramm zeigt den methodischen Ablauf zur Klonierung und Lokalisation des Gens an. Die Auflistung der Methoden im Folgenden richtet sich danach.



2.2.1 Zellkultur

Kultiviert wurde die Zelllinie L1236 in einem Brutschrank bei 37° C, 5% CO_2 -Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Die Nährlösung RPMI 1640, der 2 mM Glutamin, 1 mM hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) und 1 mM Natriumpyruvat zugesetzt waren, enthielt zusätzlich 1% Penicillin/ Streptomycin. Die Zelldichte wurde bei durchschnittlich 5×10^5 Zellen/ml gehalten und mit einer Neubauer Zählkammer gemessen.

2.2.2 RNA Präparation

Nach Abernten von ca. 5×10^6 L1236 Zellen und Zentrifugieren (300 g; 5 Min. bei 4 °C) wurde mit Hilfe des Rneasy-Kits (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend Gesamt-RNA isoliert. Die Arbeiten wurden zügig unter ribonukleasefreien Bedingungen durchgeführt. Nach Abschluss der Präparation wurden die RNA Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 70 °C aufbewahrt. Die Konzentration von 1 µl der präparierten RNA wurde anschließend photometrisch bei 260 nm vermessen.

2.2.3 Polymerasekettenreaktionen - Optimierungen und Kontrollen

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische Sequenzabschnitte der DNA mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase beliebig oft zu kopieren. Dabei wird der Bereich der zu vervielfältigenden DNA durch kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer, eingegrenzt, an denen die Polymerase mit der Synthese beginnt. Während eines PCR-Zyklus werden drei definierte Temperaturstufen mehrfach durchlaufen, wodurch es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Ursprungssequenz kommt. Zunächst trennt sich die DNA-Doppelhelix während der Denaturierungstemperatur in Einzelstränge. Bei Erreichen der Anlagerungstemperatur hybridisiert der Primer mit der komplementären Matrix, worauf die Polymerase ihre optimale Syntheseaktivität im Bereich der Extensionstemperatur entwickelt.

Vorversuche dienten hier zum einen dem Eingrenzen der optimalen Temperaturen und zum anderen der Einstellung der Konzentrationen von Primern, Nukleotiden und weiteren Zusätzen wie $MgCl_2$ und Dimethylsulfoxid (DMSO). Alle hier verwendeten Primer wurden manuell ausgewählt und mit Hilfe der Software „DNA-Star“ thermodynamisch optimiert.

Zur Vergleichbarkeit der Reaktionsansätze wurden sogenannte Mastermixes angesetzt. Für die Negativkontrollen wurde Aqua dest. statt DNA eingesetzt. Im Falle der Einzelzell-PCR wurden ca. 2 µl des Puffers, mit dem das Gewebe bedeckt war, entnommen und in der Reaktion mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten bekanntermaßen gut funktionierende Primerkombinationen mit einer ausreichenden Menge DNA von ca. 10 ng als Probe. Negativ- und Positivkontrollen wurden bei jeder Einzelzell-PCR mitgeführt.

2.2.4 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Wegen der größeren Instabilität von RNA im Vergleich zu DNA in der PCR muss diese in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu bedient man sich der enzymatischen reversen Transkription.

Die cDNA Synthese erfolgte mit Hilfe des "1st Strand cDNA Synthesis Kit" (Boehringer Mannheim) laut Protokoll des Herstellers. Ein Reaktionsansatz (20 µl) enthielt 1 µg Gesamt-RNA, 2 µl Inkubationspuffer (10x), 1 mmol/l jedes Desoxyribonukleosid-triphosphats (dNTP) (Amersham, Braunschweig), 5 mmol/l MgCl₂ und 500 ng Oligo-p(dT)₁₅ Primer. Nach einer Denaturierung dieses Ansatzes bei 65°C für 15 Minuten und anschließendem Abkühlen auf Eis wurden 20 U Reverse Transkriptase (RT) aus avian myeloblastosis virus (AMV) und 50 U RNase-Inhibitor zugegeben und bei 42°C für 1 h inkubiert. Abschließend wurde die RT bei 95°C für 5 Minuten inaktiviert und der Ansatz auf Eis gekühlt.

2.2.5 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Die Sequenz der cDNA von IκB-ε weist eine hohe Schmelztemperatur durch einen großen Guanosin/Cytosin-Gehalt auf, weshalb das „Advantage-GC cDNA PCR“ Kit (Clontech, Heidelberg) zur Anwendung kam, wobei nach den Herstellerangaben gearbeitet wurde und die Endkonzentration des „GC-Melt“-Agens 1 M betrug. Die Primer binden an den Positionen 410 und 1637 in der mRNA Sequenz, die unter der Registrierung NM_004556 in der Datenbank der National Library of Medicine (NCBI) zu finden ist. (Tabelle 3)

Tabelle 3: Sequenzen der Primer für die RT-PCR; die Bezeichnung eines Primers bezieht sich auf die Position in der mRNA Sequenz und seine Ausrichtung

Primer	Sequenz in 5' - 3' Richtung
410.for	CGG ATC CTG CTC AGA CCG
1637.rev	AGG GCA CCA GAA GAG CAC ATA GC

Ein Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 10 µl (5x) GC-PCR Puffer, 10 µl (5M) GC-Melt-Agens, 1 µl DNA, je 1 µl (10µM) Primer, 1 µl (50x) dNTP Mix (je dNTP 10 mM), 1µl (50x) Polymerase-Mix und 25 µl Aqua dest.. Es wurden 30 Zyklen durchlaufen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Programm für die RT-PCR

	Temperatur	Zeit in Min.	
Initialdenaturierung	94 °C	5:00	
Denaturierung	94 °C	1:30	30 Zyklen
Anlagerung	60 °C	1:30	
Extension	72 °C	1:30	
End-Extension	72 °C	5:00	
Konservierung	4 °C		

2.2.6 Gelelektrophorese

Von jeder PCR-Reaktion wurden 20 µl auf einem 1 %-igen Agarosegel (1 % Agarose mit 1x TBE Puffer) mit Ethidiumbromidzusatz aufgetragen und bei ca. 10 V/cm in 1x TBE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard lief fraktionierte DNA (100 bp ladder, MBI Fermentas) mit.

2.2.7 Gelextraktion

Unter einem UV-Illuminator konnten die PCR Produkte als Banden sichtbar gemacht werden. Die Banden, die der erwarteten Größe entsprachen, wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAex-Kit (Quiagen), welches auf dem Prinzip der Glasmilchextraktion beruht, nach Herstellerprotokoll gereinigt.

2.2.8 Klonierung von PCR-Produkten

2.2.8.1 Ligation

Bei der Transkription einer jeden eukaryontischen mRNA wird am 3'-Ende durch die RNA-Polymerase II ein sogenannter Poly-A-Schwanz angefügt, der auch in der RT-PCR repliziert wird. Daher kann man ein solches PCR Produkt zur Ligation recht einfach in einen Vektor einfügen, der eine komplementäre Poly-T-Klonierungsstelle besitzt. Der hier benutzte pGemTeasy-Vektor (Promega) hat eine solche Klonierungsstelle (Abbildung 3).

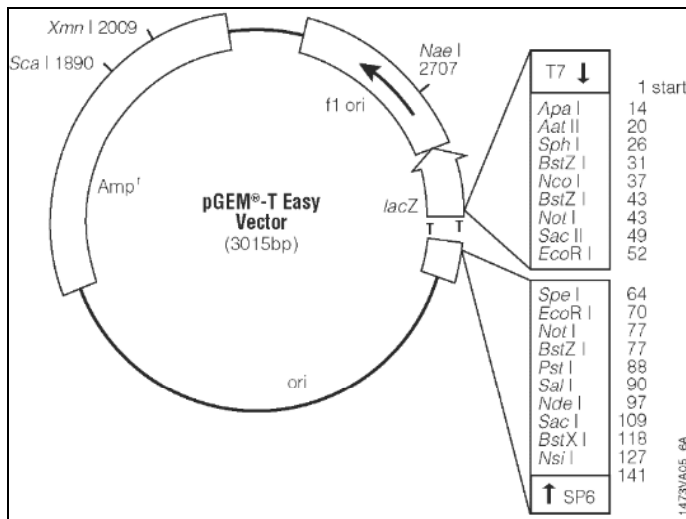


Abbildung 3: Der Vektor pGemTeasy: Die Klonierungsstelle für DNA Stränge mit Poly-A-Schwanz befindet sich zwischen T7 und SP6. pGemTeasy trägt ein Ampicillin Resistenzgen.

Gereinigtes RT-PCR-Produkt wurde mit dem Vektor pGemTeasy inkubiert, wobei das Reaktionsgemisch laut Herstellerprotokoll 7 µl DNA, 1 µl Vektor, 1 µl 1x Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase enthielt. Die Ligation erfolgte im Wasserbad bei 14 °C für 16 Stunden.

2.2.8.2 Transformation und Klonierung

Für eine Klonierung der Vektoren aus einer Ligationsreaktion ist es erforderlich, das Gemisch aus nicht ligierten Vektoren und solchen, die ein PCR-Produkt (Insert) eingebunden haben, aufzutrennen und jeweils nur einen Vektor *mit* Insert in einem Bakterienklon zu vermehren. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit Bakterien inkubiert und anschließend die erfolgreich transformierten Bakterienklone durch Blau-Weiss-Selektion ausgewählt.

Zur Transformation kompetenter, also zur Plasmidaufnahme befähigter *E. coli* Bakterien (XL-1) wurde der gekühlte Ligationsansatz mit der Bakteriensuspension für eine Minute bei 42 °C inkubiert und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Über Nacht wuchsen die Bakterien bei 37 °C im Schüttler und wurden am nächsten Tag zusammen mit IPTG und X-Gal auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach einer weiteren Inkubationsnacht bei 37 °C war es möglich, die Bakterienkolonien, die das Plasmid aufgenommen hatten, an ihrer weißen Farbe von den nicht plasmidhaltigen blauen Kolonien zu unterscheiden. Die Bakterien eines weißen Klonen wurden wiederum in ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C vermehrt. Anschließend wurden die Plasmide aus den Bakterien präpariert.

2.2.8.3 Präparation klonierter vektorieller DNA aus E. coli Bakterien

Aus den Übernachtskulturen der selektierten Bakterienklone wurde die klonierte vektorielle DNA mit Hilfe des Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert. Die so nach dem Prinzip der Ethanolfällung gereinigte DNA wurde in 150 µl Tris Puffer (pH 8,5) aufgenommen und ihre Konzentration photometrisch bei 260 nm vermessen.

Anschließend wurden die präparierten DNA Proben auf den korrekten Einbau eines Inserts mittels enzymatischem Restriktionsverdau kontrolliert. Dazu wurden von jeder Präparation 10 µl zu einem Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 30 µl) gegeben, der zusätzlich noch 3 µl 10x-Puffer (MBI Fermentas), 0,5 µl EcoR1 (MBI Fermentas) und 16,5 µl Aqua dest. enthielt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für eine Stunde und wurde durch Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten gestoppt. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem mit Ethidiumbromid versetzten 1%-igen Agarose-Gel (GIBCO BRL) wurde die Fragmentgröße des herausgeschnittenen Inserts unter einem UV-Illuminator ausgewertet.

2.2.9 Klonierung und Sequenzierung des IκB-ε Gens aus der humanen DNA Bibliothek

2.2.9.1 Screening der humanen DNA Bibliothek RPCI 1, 3-5

Die in P1-artificial-chromosomes (PAC) klonierte DNA Bibliothek RPCI 1, 3-5 wurde vom Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genom Projekts (RZPD) auf einen das IκB-ε Gen enthaltenden Klon untersucht.

Dabei kam eine 1,27 kb lange cDNA-Sonde mit der Bezeichnung IE410-1637 zum Einsatz, die durch eine RT-PCR mit den Primern 410.for und 1637.rev hergestellt und anschließend in den Vektor pGemT-easy (Promega) kloniert worden war (Protokoll siehe Abschnitt „Ligation“). In dieser Form wurde die Sonde mit Hilfe der Primer T7 und SP6 (Tabelle 5) in einer PCR amplifiziert und gleichzeitig nach dem Verfahren von Feinberg et al. radioaktiv mit P³²-Cytosintriphosphat markiert. [52]

Tabelle 5: Sequenzen der Primer T7 und SP6

Bezeichnung des Primers	Sequenz in 5' - 3' Richtung
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG

In einem automatisierten Verfahren wurden mit der markierten Sonde Nylon-Filterplatten hybridisiert, auf denen per Dot Blot die PAC-Klone der Bibliothek fixiert waren.

Nach erfolgreicher Hybridisierung der Sonde mit den entsprechenden PAC-Klonen wurden diese in *E. coli* Bakterien als Glycerol-Stock an uns zur weiteren Sequenzanalyse geliefert. Die genauen Protokolle des RZPD sind unter <https://www.rzpd.de/info/protocols> einzusehen.

2.2.9.2 Präparation von PAC DNA aus *E. coli*

Präparation für den Einsatz in einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Aus den Glycerol-Stocks (*E. coli* DH10B) als Resultate des oben beschriebenen Screenings wurden Kulturen angelegt, indem Proben eines Stocks zunächst auf LB-Agarplatten (+ Kanamycin 30 µg/ml) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht bebrütet wurden. Einzelkolonien wurden anschließend gepickt und in jeweils 10 ml LB-Medium (+ Kanamycin 30 µg/ml) bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit drei verschiedenen Pufferlösungen die Plasmid DNA aus den Bakterienkulturen extrahiert, wobei das QIAprep Mini Kit (Qiagen, Hilden) zur Anwendung kam mit den entsprechenden vom Hersteller empfohlenen Modifikationen bei einer Präparation großer low copy Plasmide wie PAC. Hierzu wurden die 10 ml Über-Nacht-Kulturen der Bakterien bei 2000rpm zentrifugiert und das entstandenen Pellet mit 500 µl Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer P2 (Qiagen) inkubierte die Lösung bei Raumtemperatur für 5 Minuten und wurde anschließend mit 1000 µl Puffer N3 (Qiagen) neutralisiert und auf Eis für weitere 5 Minuten abgekühlt. Nach Zentrifugieren bei 15000 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand in ein sauberes Eppendorf-Gefäß dekantiert, mit 1,6 ml Isopropanol versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nochmaliges Zentrifugieren mit 15000 rpm für 10 Minuten bei 4°C führte zum Absetzen eines Pellets, das zweimal mit je 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und anschließend 10 Minuten lang getrocknet wurde. Nach der Elution mit 100 - 150 µl Puffer EB (Qiagen; 10 mM Tris/ HCl pH 8,5) und kurzer Inkubation bei 70 °C konnte der DNA Gehalt der Präparation mittels Photometer bei 260 nm bestimmt werden. Diese PAC DNA Präparation wurde bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) eingesetzt.

*Präparation für den Einsatz bei der Sequenzierung des *IκB-ε* Gens*

Für die direkte Sequenzierung des *IκB-ε* Gens aus DNA des isolierten PAC Klonen wurde diese DNA mit Hilfe des NUCLEOBOND AX PC-Kit 2000 (Macherey und Nagel, Düren) nach Herstellerangaben präpariert und gereinigt. Das Kit arbeitet ebenso nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließendem Binden der DNA an Silikatsäulen. Es wurden 500 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB Medium eingesetzt.

2.2.9.3 Primerwalking

Für die Analyse der I κ B- ϵ Genstruktur im identifizierten PAC Klon wurde das Verfahren des sogenannten „Primerwalking“ angewandt. Dabei sequenziert man von den Exons ausgehend, also den bekannten Sequenzabschnitten, die der cDNA entsprechen, in die noch unbekannten Introns hinein und entwirft auf der Grundlage der gefundenen Daten einen neuen Primer, mit dem weiter in dieselbe Richtung sequenziert werden kann. Begonnen wurde die Analyse mit Primern für die T7- und SP6-Klonierungsstellen des PAC Vektors pCYPAC2, gefolgt von den jeweils neu generierten Primern (Tabelle 6).

Tabelle 6: Liste der beim Primerwalking eingesetzten Oligonukleotide; die numerischen Bezeichnungen beziehen sich auf die Position in der I κ B- ϵ Gensequenz (AF261937)

Primerbezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Richtung
840.for	CGG ATC CTG CTC AGA CCG
1371.rev	GAG TTT GGA AGA GCG AAT GG
1314.rev	GAC CTG TTG CGG CTC TTG G
3178.for	GCT AGT TAA AGT TTG ATG TGT TCC
3713.rev	AAA CTC TCT GTT AGG CTC CAT TC
3632.rev	AGC AGC TGG TAT GTG TCT CTA TC
3937.for	GGC TCG GTA GTA TTT CCT TGG
4255.for	CCA GAG CCA GGC AGA GGA ACA TC
4375.rev	CCC TAT CTC CTA TGC CCT CCT C
4650.rev	AGA TGC AAG TGT AGC TCC TAG G
4638.rev	AGC TCC TAG GAT AAC GTC TGG C
5956.rev	AGA ACC TCT CTC TGC TAT GGG
5289.for	ACA TTG AGT GGG CTG TGA GTC
5339.for	GAA GAG AGG GAG TTG GTG GAT G
5629.for	CCT TGG CTG ACA TCC TTA TTC C
5692.rev	GCC AGG TGC AGC GCT GTC TTA C
6825.rev	AGG GCA CCA GAA GAG CAC ATA GC
6490.for	CAG AGG GGC CAC TAT TTT GAG G
6506.for	TTG AGG ATT CGT GTG AAG ATT TG
pac1_mpi01	TTC CTT CTC CTG TGG TTC CTT G
mpi_02 an mpi01	GCA GCG AGG ACA AGG TTC GG
mpi_03 an mpi02	CGC ATG TAC TGT TTC CTT CTT TC

Primerbezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Richtung
mpi_04 an mpi03	CGG ACT ACC AAA GTG CTG GGA TTA C
pac1_mpi.05.rev	CGA TCT GCC TGC CTC GGA CTA CC
pac-3927.for	TGA CAG GGG AAG GGC TCG GTA GT
pac-2541.rev	GGG GAA AAC GAA AGC CAG TGA TG
pac-3138.rev	AAG TGA GGG TTG GTG TGG GAA GC

2.2.9.4 Sequenzierung des PAC Klons

Für alle Sequenzierungsreaktionen kam die Kettenabbruchtechnik nach Sanger mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide ddNTP zur Anwendung (BigDye Terminator, ABI). Dabei handelt es sich im Prinzip um eine PCR, bei der allerdings nur ein Primer und neben Desoxynukleotiden (dNTP) auch Didesoxynukleotide (ddNTP) eingesetzt werden.

Kommt es zum Einbau eines solchen ddNTP in den DNA Strang, bricht die Kettensynthese ab. Statistisch entstehen so für die gesamte Länge der zu untersuchenden Sequenz Ketten, die jeweils um eine Base verkürzt sind und an deren 3'-Ende ein markiertes ddNTP steht, das komplementär zum Gegenstrang ist. Nach elektrophoretischer Auftrennung wird das an das ddNTP gebundene Fluorochrom mit einem Laser angeregt, detektiert und so die Reihenfolge der Basen in der gesamten Sequenz ermittelt.

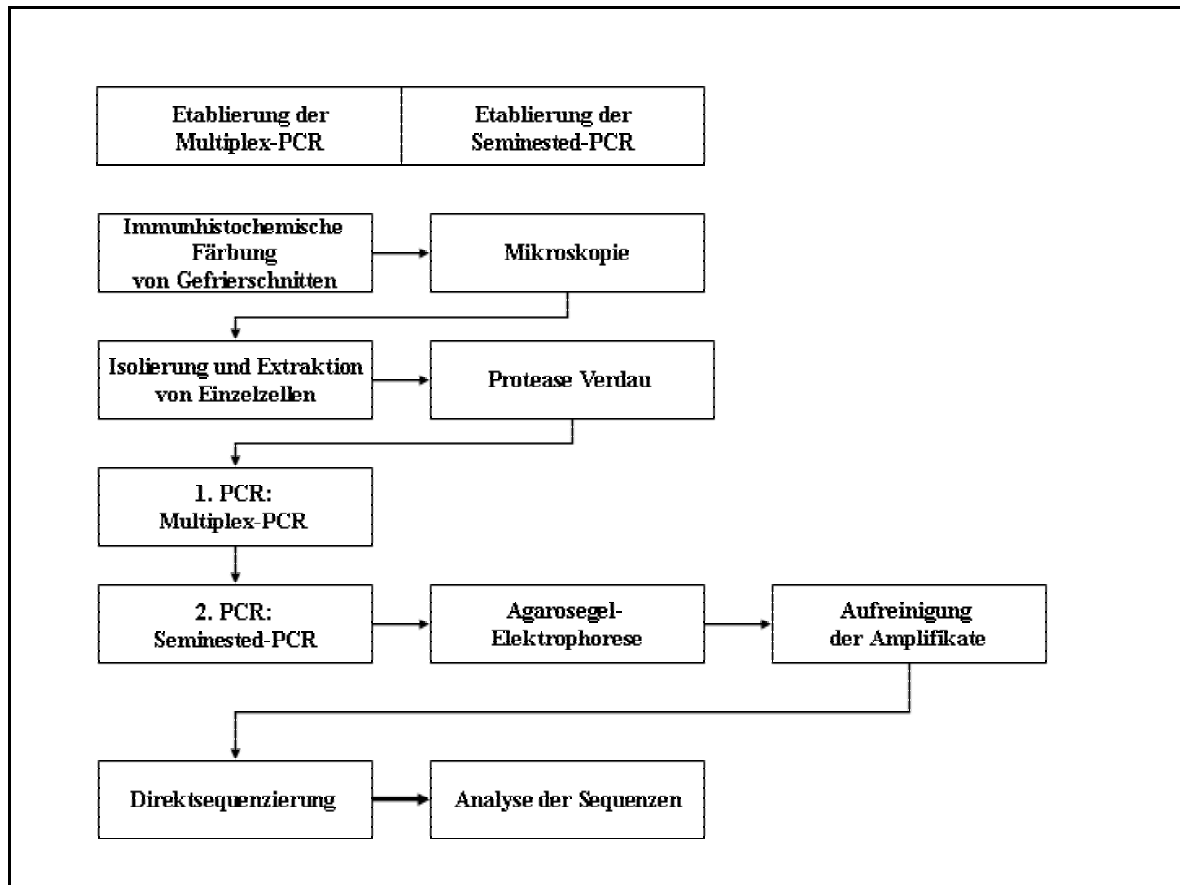
Die Sequenzreaktion wurde mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) und die anschließende elektrophoretische Trennung im 3700 DNA Analyzer (ABI) durchgeführt. Eine Sequenzreaktion von 10 µl enthielt 1 µg PAC DNA, 40 pmol Primer, 4 µl Premix (ABI) und entsprechend bis zum Endvolumen Aqua dest..

2.2.10 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Zur chromosomalen Lokalisation des IκB-ε Gens durch die Technik der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) [53] wurde der beim Screening der PAC-Bibliothek identifizierte Klon RPCI-5 1157N16 verwendet und nach einer Biotin bzw. Digoxigenin Markierung durch Nicktranslation [54] mit Inter- bzw. Metaphasekernen normaler mononukleären Kontrollzellen inkubiert. Zusätzlich wurden kommerziell erhältliche chromosomenspezifische Sonden der Firma Appligene ONCOR verwendet. Ein Inkubationsansatz zur Hybridisierung enthielt 250 ng markierte PAC Klon DNA, 10 µg Cot-1 fraktionierte DNA und 10 µg Heringssperma DNA. Die jeweils als Doppelfärbung, also aus PAC-Probe und chromosomenspezifischer Probe, angefertigten Präparate wurden mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Axiophot, Zeiss Oberkochen) analysiert und mit einer CCD (charge-coupled device) Kamera zur Dokumentation abgelichtet. (Xillix Microimager MI 1400, Xillix Technologies, Richmond, Canada) Durch digitale Bildverarbeitung

wurden anschließend die mit verschiedenen Filtern erhaltenen Bilder überlagert und somit die Dokumentation von Zwei-Farben-Experimenten durch gleichzeitige Darstellung verschiedener Signale ermöglicht. Hierzu wurden Computer-Programme auf Apple Macintosh-Basis verwendet: Adobe Photoshop, Version D1-2.0.1 (Fa. Adobe Systems), IMaxx Video Capture Boards, Version 3.0.1b3 (Fa. Precision Digital Images, Redmond, USA). Auf diese Weise verarbeitete Bilder wurden mit einer Spiegelreflexkamera vom Bildschirm eines Apple Macintosh-Computers (Quadra 950, Fa. Apple Computer, Ismaning) auf Kodak Ektachrome 160T Dia-Film aufgenommen.

2.3 METHODEN - ANALYSE VON EINZELZELLEN AUS PRIMÄRMATERIAL



2.3.1 Immunfärbung der Biopsate

Die immunhistochemische Färbung dient der selektiven Visualisierung von Zellen mit bestimmten Antigenstrukturen durch spezifische meist monoklonale Antikörper. Hier wurde die sogenannte Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode auf das CD30 Epitop angewandt. Das CD30 Antigen wird in normalem Gewebe bis auf die Ausnahme weniger aktivierter T- und B-Lymphozyten nicht exprimiert. Besonders starke CD30 Expression zeigen jedoch H/RS Zellen des Hodgkin-Lymphoms und Tumorzellen des anaplastischen großzelligen Lymphoms. [6, 55]

Von den Gewebeproben der Patienten wurden Gefrierschnitte (10 µm) angefertigt, 1 bis 2 Stunden getrocknet, 10 Minuten mit Aceton fixiert und mit dem murinen monoklonalen CD30-Antikörper, Ber-H2, bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten inkubiert. Nach Waschen mit Tris-Puffer wurde der Brückenantikörper, Kaninchen-Anti-Maus, für 30 Minuten bei RT zugegeben und ebenso mit Tris-Puffer abgewaschen.

Die anschließende Inkubation für 30 Minuten mit dem APAAP-Komplex wurde durch Waschen mit Tris-Puffer beendet und die Immunfärbung nach Zugabe von Neufuchsin abgeschlossen. Eine unspezifische Gegenfärbung von Zellkernen wurde mit Hämalaun durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden unmittelbar anschließend für die Einzelzellextraktion verwendet, um ein Degradieren der DNA zu minimieren. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Schnitte mit trisgepufferten Kochsalzlösungen (TBS) steigenden Ethanolgehalts (50% 2 Minuten, 80% 2 Minuten) und schließlich reinem Ethanol (96% für 10 Sekunden) dehydriert und bei -70°C in einem Behälter, der CaCl_2 als Feuchtigkeitsabsorbens enthielt, eingefroren.

2.3.2 Auswahlkriterien der Zellen

Vor einer zellspezifischen DNA-Analyse steht die Extraktion der einzelnen Zelle aus dem Gewebeverband, was seit der Einführung von Mikromanipulationseinrichtungen unter dem Lichtmikroskop möglich ist. Als H/RS Tumorzellen wurden diejenigen Riesenzellen ausgewählt und entnommen, die polynukleäre Kerne aufwiesen und sich in der CD30 Immunfärbung positiv darstellten. Dabei sollten sie sich für eine kontaminationsfreie Entnahme in einer Ebene und ohne Überlappung mit den umliegenden Zellen befinden. Als reaktive nicht maligne Bystanderzellen wurden Lymphozyten mit normaler Kern-Plasma-Relation und negativem CD30 Immunophänotyp extrahiert.

2.3.3 Extraktion von Einzelzellen aus dem Gewebeverband

Zu Beginn einer jeden Zellextraktion mussten die Gefrierschnitte mithilfe eines TBS-Puffer-Ethanolgemisches fallender Konzentration rehydriert werden (96% für 10 Sek.; 80% 2 Min.; 50% 2 Min.). Anschließend wurde das Gewebe mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) vorsichtig gespült, in das Umkehrmikroskop (Diaphot 300, Nikon) eingespannt und mit PBS überschichtet. Unter Sicht mit 600-facher Vergrößerung wurden aus dem Gewebe einzelne Zellen – sowohl H/RS Tumorzellen als auch normale sogenannte Bystanderzellen - mit Hilfe von hydraulischen Mikromanipulatoren (Narishige, Tokio) isoliert. Dabei wurde mit einer Glasspitze die ausgewählte Zelle mobilisiert und vorsichtig aus dem Zellverband gelöst. Bei der Zellextraktion musste ein Verletzen der umliegenden Zellen unbedingt vermieden werden, um Kontaminationen durch DNA anderer Herkunft als der aus der extrahierten Zelle zu verhindern. (Abbildung 4) Außerdem wurde zur Kontaminationskontrolle nach jeder Extraktion eine Pufferprobe aus dem Manipulationsgebiet gezogen, die mindestens zehnmal so groß war (ca. $1\mu\text{l}$) wie das Puffervolumen, in dem eine Zelle extrahiert wurde ($0,05\text{--}0,1\mu\text{l}$). Die gelöste Zelle wurde in einer Glaskapillare aufgefangen und in ein $100\mu\text{l}$ PCR-Reaktionsgefäß überführt, das mit $10\mu\text{l}$ PCR-Puffer (GeneAmp Buffer, PE Applied Biosystems) und ProteinaseK 1 mg/ml (Boehringer, Mannheim) gefüllt war. Die Pufferproben wurden parallel gleichermaßen behandelt. Zum Verdau aller zellulären Proteine wurde der Inhalt der PCR-Gefäße anschließend kurz zentrifugiert und bei 50°C für eine Stunde im Thermocycler

inkubiert. Inaktiviert wurde die Proteinase K des Ansatzes durch abschließendes Erhitzen auf 96 °C für 10 Minuten und rasches Abkühlen auf 4 °C. Jede Zellextraktion wurde fotografisch vor und nach der Entnahme dokumentiert. Die so behandelten Zell- und Pufferextrakte dienten im folgenden als Vorlage für die Polymerasekettenreaktionen (PCR).

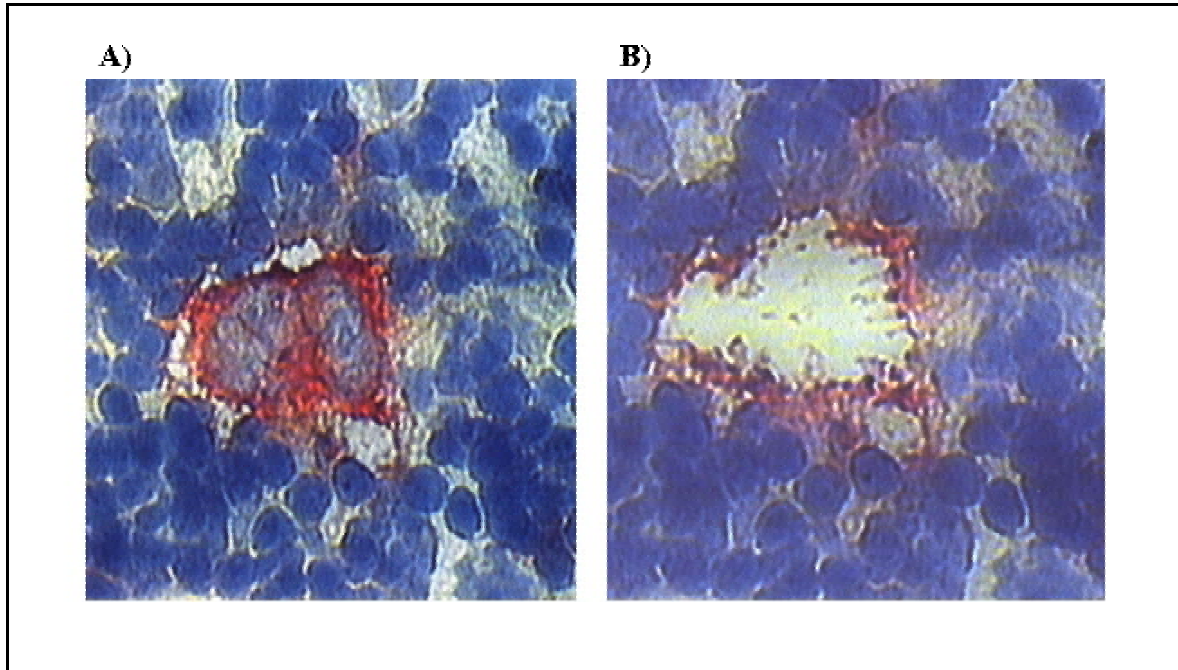


Abbildung 4: Dokumentation des Extraktionsvorganges A) zeigt eine durch anti-CD30 rot gefärbte H/RS Zelle vor der Extraktion. B) Zustand nach der Entnahme der H/RS Zelle. Die umliegenden Zellen wurden nicht verletzt.

2.3.4 Multiplex- und Semಿನested-PCR

Da eine einzige Reed-Sternberg-Zelle einen genomischen DNA-Gehalt von ca. 10 pg hat, ist eine einfache PCR nicht ausreichend, um die Sequenz des $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ Gens in analysierbarer Menge zu kopieren. Deshalb musste die spezifische DNA einer jeden Zelle in zwei aufeinanderfolgenden Schritten amplifiziert werden.

Um alle Exone und die angrenzenden Intron-Bereiche analysieren zu können, wurden fünf Gruppen mit jeweils drei Primern generiert, mit deren Hilfe fünf sich nicht überlappende Produkte entstanden. Dabei wurden in der ersten Reaktion im Sinne einer Multiplex-PCR alle fünf Amplifikate gemeinsam in einem einzigen Ansatz produziert. 1,5 μl daraus dienten in der anschließenden Semಿನested-PCR als Probe, wobei ein Primer aus der Primäramplifikation mit einem zweiten neuen, etwas weiter innerhalb des Primärproduktes hybridisierenden Primer kombiniert wurde und somit aus dem Gemisch aller fünf Primäramplifikate nur das jeweils spezifische vervielfältigt wurde (Abbildung 5).

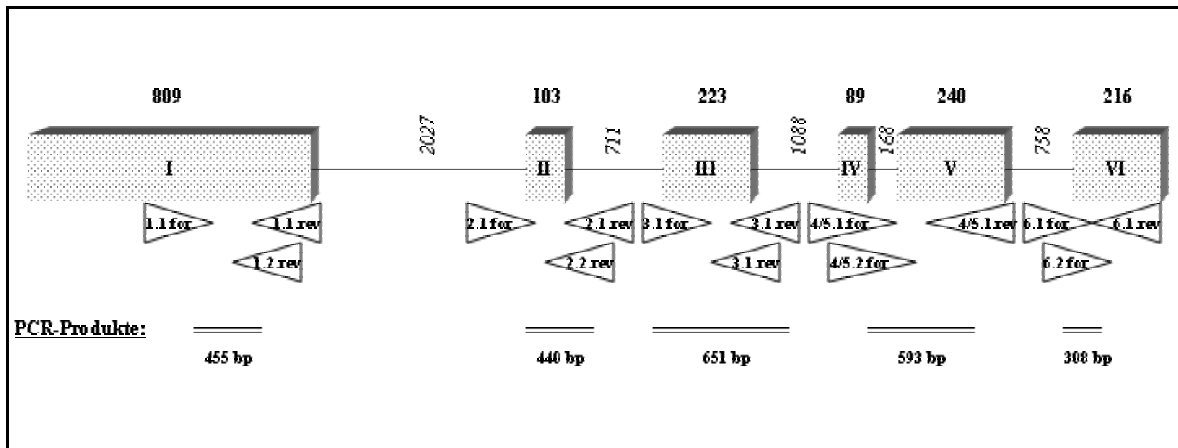


Abbildung 5: PCR Strategie: Exons des IκB-ε Gens sind als Blöcke dargestellt, dazwischen Introns. Die waagerechten Zahlen geben die Größe der Exons in bp an, die senkrechten die der Introns. Primer der Primäramplifikation sind in der oberen Reihe dargestellt. Der zusätzliche Primer zur Reamplifikation darunter. Die PCR Produktgrößen resultieren aus der Reamplifikation.

Ein Reaktionsansatz der Primäramplifikation enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl 1,8-fach konzentrierten PCR-Puffer (GeneAmp Buffer, PE Applied Biosystems), 400 µM je dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 2,5 mM MgCl₂ (PE Applied Biosystems), 100 nM je Primer (Tabelle 7) (BioTez, Berlin-Buch), 2,5 % DMSO (Sigma) und 5 U AmpliTaq- Gold (PE Applied Biosystems).

Für die Reamplifikation galt folgendes: 1,5 µl DNA-Probe aus dem Primäransatz; 2-fach konzentrierter PCR-Puffer; 200 µM je dNTP; 2,5 mM MgCl₂; 90 nM je Primer (Tabelle 7), 2,5 % DMSO und 5 U Taq-Polymerase.

Tabelle 7: Sequenzen der Primer, die bei der Multiplex- und Seminested-PCR eingesetzt wurden. Die erste Ziffer in der Bezeichnung bezieht sich auf das zu amplifizierende Exon. Bei gleicher Ausrichtung (for = stromaufwärts bzw. rev = stromabwärts) zeigt die zweite Ziffer an, ob der Primer in der Primär- (1) oder Sekundär-PCR (2) eingesetzt wurde.

Primerbezeichnung	Sequenz in 5' – 3' Richtung
1.1.for	CGG ATC CTG CTC AGA CCG
1.1.rev	GAG TTT GGA AGA GCG AAT GG
1.2.rev	GAC CTG TTG CGG CTC TTG G
2.1.for	GCT AGT TAA AGT TTG ATG TGT TCC
2.1.rev	AAA CTC TCT GTT AGG CTC CAT TC
2.2.rev	AGC AGC TGG TAT GTG TCT CTA TC
3.1.for	GGC TCG GTA GTA TTT CCT TGG

Primerbezeichnung	Sequenz in 5' – 3' Richtung
3.1.rev	AGA TGC AAG TGT AGC TCC TAG G
3.2.rev	AGC TCC TAG GAT AAC GTC TGG C
4_5.1.rev	AGA ACC TCT CTC TGC TAT GGG
4_5.1.for	ACA TTG AGT GGG CTG TGA GTC
4_5.2.for	GAA GAG AGG GAG TTG GTG GAT G
6.1.rev	AGG GCA CCA GAA GAG CAC ATA GC
6.1.for	CAG AGG GGC CAC TAT TTT GAG G
6.2.for	TTG AGG ATT CGT GTG AAG ATT TG

Es wurden je Reaktionsansatz 40 Zyklen durchlaufen (Tabelle 8). Als Positivkontrolle wurden in Primär- und Reamplifikation 50 pg genomischer DNA (L1236) und entsprechend als Negativkontrolle Aqua dest. mitgeführt. Zur Kontaminationskontrolle bei der Zellextraktion dienten die an entsprechender Stelle beschriebenen Pufferproben.

Tabelle 8: Gemeinsames Programm für die Multiplex- und Seminested-PCR

	Temperatur	Zeit in Min.	
Initialdenaturierung	95 °C	10:00	
1. Denaturierung	94 °C	0:25	10 Zyklen
1. Anlagerung	60,3 °C	1:15.	
1. Extension	72 °C	1:15.	
2. Denaturierung	94 °C	0:25	
2. Anlagerung	60,3 °C	0:45	30 Zyklen
2. Extension	72 °C	1:00	
End-Extension	72 °C	10:00	
			dann auf 4 °C

2.3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Eine Probe (7 µl) eines jeden PCR-Ansatzes wurde auf ein 1%-iges Agarose-Gel (GIBCO, BRL), dem Ethidiumbromid zugefügt war, aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Unter UV-Licht konnten die gewünschten Banden identifiziert, ausgeschnitten und anschließend die DNA aus dem Gel mit Hilfe der Glasmilch-Technik (QIAquick, Qiagen) extrahiert werden.

War nur eine einzelne saubere Banden aus der Reamplifikation auf dem Kontrollgel zu erkennen, wurde der gesamte Reaktionsansatz mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) über eine Säule gereinigt.

2.3.6 Sequenzierung der Amplifikate aus Einzelzellen

Das generelle Prinzip der Sequenzierung ist unter 2.2.9.4 erläutert, und es gelten die dort gemachten Angaben zur Durchführung der Reaktion auch für die Sequenzierung der Amplifikate aus Einzelzellen. Bei diesen wurden Strang und Gegenstrang direkt sequenziert, wobei die entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer der Seminested-PCR eingesetzt worden sind.

Eine Sequenzreaktion von 10 µl enthielt 10-100 ng PCR-Produkt oder in pGemTeasy klonierte DNA bzw. 250 – 300 ng PAC DNA, 5 ng/ µl Primer, 4 µl Premix (ABI) und entsprechend bis zum Endvolumen Aqua dest.. Die Sequenzierungs-PCR wurde im Hinblick auf die jeweiligen Temperaturen in Anlehnung an die Bedingungen der Einzelzell PCR programmiert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Programm für die Sequenzierungs-PCR

	Temperatur	Zeit in Min.	
Initialdenaturierung	95 °C	2:00	
Denaturierung	96 °C	0:15	
Anlagerung (ramp 45)	45 °C	0:15	
Extension	60 °C	4:00	25 Zyklen

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mittels Ethanolfällung [51] gereinigt und präzipitiert und in 24 µl TSR-Puffer (ABI) aufgenommen. Nach einer Denaturierung bei 96 °C für 2 Minuten und sofortiger Abkühlung auf Eis konnte die DNA-Probe der Sequenzierung in den Automaten 310 und 377 (ABI) zugeführt werden.

2.4 VERWENDETE COMPUTERPROGRAMME

Für die Auswahl und thermodynamische Optimierung der Primer wurde das Programm „Primerselect“ (DNA-Star) verwendet. Die Sequenzierungsergebnisse wurden als Konsensussequenz vereinigt (Strang und Gegenstrang) und anschließend mit den Daten des IκB-ε Gens (AF261937) verglichen. Dies geschah sowohl mit Hilfe des „SequenceNavigators“ (ABI), als auch mit „SeqMan“ und „MegAlign“ (DNA-Star). Für die Motivsuche innerhalb der Promotorregion des IκB-ε-Gens wurde das internetgestützte Programm „TESS“ der Universität Pennsylvania, USA, benutzt. www.cbil.upenn.edu/tess. [56]

3 ERGEBNISSE

3.1 STRUKTUR UND CHROMOSOMALE LAGE DES I κ B- ϵ GENS

3.1.1 Klonierung und Sequenzierung

Die strukturelle Kenntnis des I κ B- ϵ Gens war Voraussetzung für die Etablierung einer Einzelzell-PCR, mit der primäre Tumorzellen auf genomische Aberrationen untersucht werden konnten.

Dazu wurden Primer aus den Daten der bekannten mRNA Sequenz von humanem I κ B- ϵ (NM_004556) an den Nukleotidpositionen 410 und 1637 generiert, mit deren Hilfe eine 1,27 kb lange cDNA-Sonde hergestellt werden konnte. Als Vorlage diente dazu Gesamt-RNA aus Zellen der Linie L1236. Das PCR-Produkt wurde nach dem Verfahren der klassischen Klonierung in den Vektor pGemTeasy gebracht und durch Sequenzierung auf seine korrekte Sequenz überprüft. Die so klonierte cDNA-Sonde wurde radioaktiv markiert und mit der humanen DNA-Bibliothek RPCI1, 3-5 human PAC hybridisiert, um auf diese Weise einen die genomische Sequenz von I κ B- ϵ tragenden PAC Klon zu identifizieren. Insgesamt gaben vierzehn PAC-Klone ein positives Signal, wovon der am stärksten signalgebende Klon mit der Bezeichnung RPCI-5 1157N16 ausgewählt und sequenziert wurde. Es zeigte sich, dass dieser den kodierenden Bereich des I κ B- ϵ Gens in voller Länge enthielt.

Da die Lage der gesuchten Sequenz innerhalb des PAC Konstruktes unbekannt war, wurde die Sequenzierung an den beiden Klonierungsstellen mit T7 und SP6 Primern begonnen. Es ergaben sich jedoch unspezifische Sequenzen, weshalb zur Methode des Primerwalking mit Oligonukleotiden auf der Basis der bekannten cDNA Sequenz gewechselt wurde. Hierdurch konnten sich überlappende Einzelsequenzen gewonnen werden, die mit Hilfe der Software „DNA-Star“ zur Gesamtsequenz des I κ B- ϵ Gens zusammengefügt und unter der Bezeichnung AF261937 in die NCBI Genbank eingespeist wurden. (Direkter Link:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=20530138>)

Zusätzlich konnte die Abfolge weiterer 420 Basen über das aufgrund der mRNA Daten bekannte 5'-Ende hinaus ermittelt werden.

3.1.2 Die Struktur des IκB-ε Gens

Das IκB-ε Gen ist aus sechs Exons (365 bp, 103 bp, 223 bp, 89 bp, 240 bp, 216 bp) und fünf Introns (2027 bp, 711 bp, 1088 bp, 168 bp, 758 bp) aufgebaut und umfaßt ca. 6,8 kb. Die Konsensussequenzen an den Intron-Exon-Übergängen folgen allesamt der so genannten „GT-AG Regel“ und markieren damit die Spleißstellen, an denen die Introns während des Prozessierens der RNA herausgeschnitten werden. Das Startkodon für den Beginn der Translation liegt in Exon 1 (ATG - Pos. 884), das Stopkodon in Exon 6 (GAC - Pos. 6719).

Alle Mitglieder der IκB Familie können mit NFκ-B über hochkonservierte Motive, so genannten Ankyrinrepeats, interagieren. Diese bestehen aus 33 Aminosäuren und ermöglichen eine direkte Protein-Protein-Bindung. IκB-ε besitzt ebenso wie die anderen Inhibitoren der Familie sechs Ankyrinrepeats, welche von den Exons 1 bis 5 kodiert sind. Die kodierenden Sequenzen der Ankyrinrepeats 3, 5 und 6 liegen jeweils ununterbrochen auf einem Exon. Im Gegensatz dazu werden die kodierenden Abschnitte für die Ankyrinrepeats 1 und 2 von je einem Intron (Nr. 1 bzw. 2) und des Repeat 4 von zwei Introns (Nr. 3 und 4) unterbrochen (Abbildung 6).

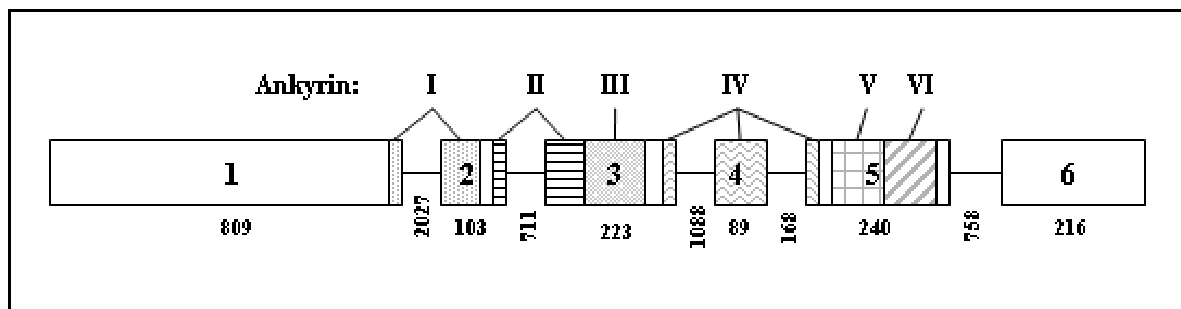


Abbildung 6: Schematische Darstellung des IκB-ε Gens. Die Kästchen (für Exons mit arabischer Nummerierung) werden durch Strecken (für Introns) verbunden. Innerhalb der Kästchen sind unterschiedlich gemustert die Ankyrinrepeats symbolisiert und durch römische Zahlen nummeriert. Horizontal gedruckte Zahlen unterhalb der Darstellung geben die Größe der Exons in bp an; vertikal gedruckte die der Introns. Die abweichende Längenangabe des ersten Exons mit 809 bp statt 365 bp kommt durch zusätzliche nicht translatierte Abschnitte jenseits des 5' Endes zustande.

3.1.3 Unterschiede zwischen genomischer und mRNA Sequenz

Die Aufklärung der genomischen Struktur von IκB-ε brachte im Vergleich mit der bisher bekannten mRNA-Sequenz (NM_004556) an acht Stellen Abweichungen zu Tage, die sowohl den nichtkodierenden 5'-Bereich als auch mehrere kodierende Stellen der Exons 1, 3 und 5 betreffen. Dabei haben die Sequenzveränderungen sowohl an den Positionen 654, 768 und 778 (nicht kodierende Region), als auch bei 4185 (Intron 2) keine Auswirkungen auf Proteinebene. Zu einem einfachen Aminosäureaustausch kommt es durch eine Transition in Exon 1 an Position 1163 und in Exon 5 an Position 5665. Die größte Veränderung der Aminosäuresequenz entsteht durch eine Kombination von Insertions- und Deletionsmutationen eng benachbarter Nukleotide in Exon 3 an den Positionen 4219 und 4255. Diese Veränderung liegt im dritten Ankyrin Repeat und damit als einzige innerhalb eines Motivs (Tabelle 10).

Tabelle 10: Abweichungen der Sequenz des IκB-ε Gens (AF261937) von der bisher bekannten cDNA (NM_004556) und die entsprechenden Veränderungen der Primärstruktur des resultierenden Proteins. Die Zahlen geben jeweils die Position der Nukleotide in der entsprechenden Sequenz an. Die Positionsangaben der Aminosäuren beziehen sich auf die Proteinsequenz von IκB-ε. n.k. = nicht kodierende Region; del = Deletion; sonst Standardabkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide

cDNA (NM_004556)	Gen (AF261937)	Lage	Resultierende Aminosäuresequenz	Ankyrin Repeat
222 ggc	654 ccg	n.k.	keine	-
335 g	768 c	n.k.	keine	-
345 g	778 c	n.k.	keine	-
730 c	1163 g	Exon 1	94 P → A	-
1014 a	4185 t	Intron 2	keine	-
1048 t (del)	4219 ca	Exon 3	200 SWPVPAACWKGG →	3
1081 g	4255 (del)	Exon 3	HLACARCLLEGR	3
1237 t	5665 a	Exon 5	263 S → T	-

3.1.4 Nicht translatierte Region (UTR)

Über das 5'-Ende der kodierenden Sequenz hinaus wurde die Abfolge weiterer Basen ermittelt und versucht, potentielle Bindungsdomänen von Transkriptionsfaktoren auszumachen. Bei diesen Strukturen handelt es sich um regulatorische Elemente eines Gens, welche die Transkription steuern.

Die theoretische Vorhersage, ob es sich um eine solche Domäne handeln könnte, wurde mit Hilfe des internetgestützten Programms TESS, das auf eine Datenbank aus Konsensussequenzen für

Transkriptionsfaktoren zurückgreift, getroffen. Es sind hier nur solche Bindungsdomänen für Faktoren aufgeführt, deren Kernsequenz eine hundertprozentige Homologie zu den experimentell gefundenen Sequenzdaten aufweist (Abbildung 7).



Abbildung 7: Darstellung der 5'-UTR: Potentielle Bindungsdomänen für Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen und die entsprechende Sequenz kursiv gedruckt. Nuclear Factor kappa B (NFκ-B), Activator Protein 1 (AP-1), Stimulating Protein 1 (SP-1), Runt-Factor (AML-1a), Protein C/EBP, Signal Transducer and Activator of Transcription (STATx), GC-Box, TATA-Box, Cap-Signal. Der Translationsstart ist mit "M" angegeben.

Für die Übereinstimmung der Datenbank mit der Umgebung einer Domänenkernsequenz wurde eine Homologie von mindestens 85 % - in den meisten Fällen jedoch mindestens 90% gewählt. Für die nichttranslatierte 5'-Region des IκB-ε Gens zeigten sich insbesondere potentielle Bindungsstellen für die Untereinheit p50 des „nuclear factor kappa B“ (NFκ-B), das „activator protein 1“ (AP-1), das „stimulating protein 1“ (SP-1), den „runt-factor“ (AML-1a), das Protein C/EBP, das Motiv der „signal transducer and activator of transcription“ (STATx), die GC-Box, die TATA-Box und das cap-Signal für den Transkriptionsstart. Dazu ist zu bemerken, dass sich manche dieser Motive teilweise überschneiden und sowohl auf dem kodierenden Strang als auch auf dem Gegenstrang gefunden wurden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammenfassung der potentiellen Bindungsdomänen für Transkriptionsfaktoren in der nichttranslatierten 5'-Region des IκB-ε Gens; alle aufgeführten Kernsequenzen haben eine Homologie von 100% zu den bekannten Bindungsdomänen. Die Positionsangaben beziehen sich auf die Sequenz AF261937.

Domäne/ Motiv	Position	Richtung 5' - 3'	Kernsequenz	Matrix-Homologie
AML-1a	506--501	Gegenstrang	TGTGGT	100%
AP-1	483--491	Strang	GTGAGTCAA	99%
	491--483	Gegenstrang	TTGACTCAC	93%
cap-Signal	442--435	Gegenstrang	TCACTCTT	96%
C/EBPbeta	359--372	Strang	GAATTAAGAAATAG	91%
c-Rel	535--544	Strang	GGGGGATTCC	97%
GC-Box	589--602	Strang	AGGGGGCGGGGCCA	99%
	546--559	Strang	GAGGGGCGGGGCCT	99%
NFκ-B	536--545	Strang	GGGGATTCCG	90%
SP-1	589--601	Strang	AGGGGGCGGGGCC	100%
	546--558	Strang	GAGGGGCGGGGCC	99%
	630--642	Strang	GAGGGGCGGGGCG	98%
STATx	561--569	Strang	TTCCGGAA	88%
	569--561	Gegenstrang	TTCCGAAA	85%
TATA-Box	333--358	Strang	AAATAAAAAAATAAA	86%

3.1.5 Chromosomale Lokalisierung mittels FISH

Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) konnte für das I κ B- ϵ Gen nachgewiesen werden, dass es in einfacher Kopie im menschlichen Genom vorhanden ist und keine Pseudogene existieren. Die I κ B- ϵ spezifische Sonde hybridisierte nahe des Zentromers auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, so dass aufgrund dieser Befunde die Lage des Gens auf 6p11 ermittelt wurde (Abbildung 8).

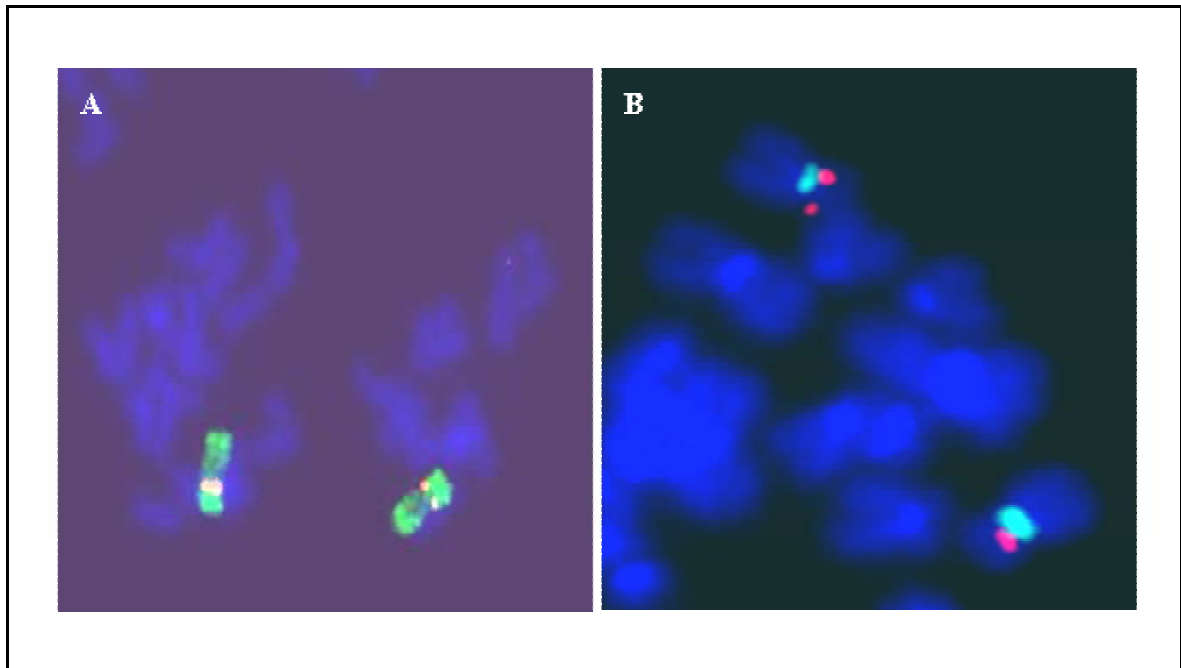


Abbildung 8: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der I κ B- ϵ spezifischen PAC-Sonde an Meta- und Interphasekernen normaler humaner Leukozyten. Unspezifische Kern-Färbung mit DAPI (blau) **A)** Chromosom 6 erscheint grün (FITC-konjugierter Antikörper; durch Digoxigenin markierte spezifische „hole painting“ Sonde für Chr. 6). Die Biotin-konjugierte I κ B- ϵ -Sonde hier rot sichtbar durch Streptavidin-Cy3. **B)** Chromosom 6 spezifische Zentromer-Sonde (blau); die I κ B- ϵ -Sonde (rot) hybridisiert zentromernah auf dem kurzen Arm (6p).

3.2 UNTERSUCHUNG DES I κ B- ϵ GENS IN HODGKIN/ REED-STERNBERG ZELLEN

3.2.1 Etablierung der PCR-Methode zur Untersuchung von Einzelzellen

Für die Untersuchung der kodierenden Abschnitte des I κ B- ϵ Gens in primären Tumorzellen wurde eine Einzelzell-PCR etabliert. Dazu wurden insgesamt 15 intronspezifische Primer hergestellt. Der Ort der Hybridisierung wurde so gewählt, dass das resultierende Amplifikat nicht nur die exonische Sequenz, sondern auch die entsprechenden 5'- und 3'- Splicestellen enthielt. Auch eine Überlappung der Amplifikate wurde vermieden. Nach Anpassung aller Primer im Hinblick auf ihre Interaktionen einerseits, und nach thermodynamischer und chemischer Optimierung der PCR-Bedingungen andererseits, musste die Sensitivität der Methode auf den ungefähren DNA-Gehalt einer Zelle von 7-10 pg angepasst werden. Dabei kam genomische DNA der Zelllinie L1236 in immer höherer Verdünnung zum Einsatz (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 25 pg und 10 pg). Um Fehler der Verdünnungsschritte zu erkennen, wurden bei einer Test-PCR immer mindestens zwei separat verdünnte 10 pg DNA Proben eingesetzt.

Mit den fünf Primerpaaren der ersten Reaktionsrunde entstanden fünf primäre Produkte (531 bp, 535 bp, 713 bp, 667 bp, 335 bp), wobei nur drei auf dem Gel sichtbar wurden, was auf ihre geringen Größenunterschiede bei ca. 700 bp und 530 bp zurückzuführen war. Ab einer Vorlage von 1 ng genomischer DNA war nach der ersten Amplifikation (Multiplex-PCR) kein Produkt mehr in der Gelelektrophorese zu erkennen (Abbildung 9A).

Von jeder Verdünnungsstufe der ersten PCR wurde mit den entsprechenden sekundären Primerpaaren für jedes Amplifikat eine separate Seminested-PCR durchgeführt. Nach der Reamplifikation folgte eine elektrophoretische Auftrennung der Produkte. Die Größen der sekundären Produkte lagen bei 455 bp (Exon 1), 440 bp (Exon 2), 651 bp (Exon 3), 593 bp (Exons 4 + 5) und 308 bp (Exon 6) (Abbildung 9B).

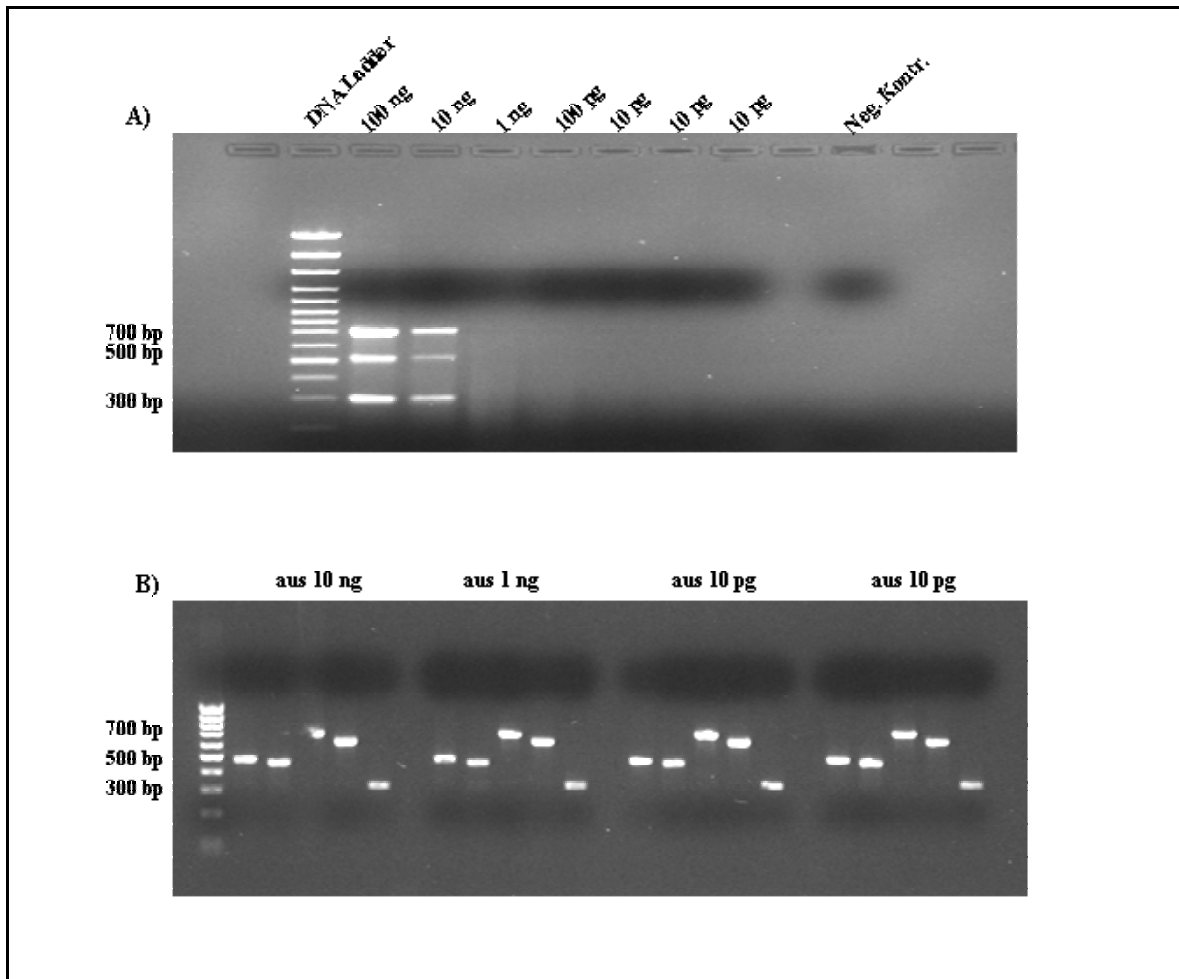


Abbildung 9: A) Gelelektrophorese der Multiplex-PCR (Primäramplifikation); Optimierung der Methode auf den DNA-Gehalt einer Einzelzelle von ca. 10 fg; Genomische DNA stammt aus L1236 Zellen; Leerkontrolle ist Aqua dest. B) Gelelektrophorese der Nested-PCR (Sekundäramplifikation) Obere Reihe: 5 µl aus den beiden 10 pg Verdünnungen der vorigen Multiplex-PCR als Vorlagen. Untere Reihe: Leerkontrollen mit Aqua dest.

Abschließend wurden die Produkte aus dem Gel extrahiert und mit den entsprechenden sekundären Primern in beide Richtungen direkt sequenziert. Aus den beiden komplementären Einzelsequenzen wurde eine Konsensussequenz erstellt, um so Sequenzierungsfehler auszugleichen.

3.2.2 Analyse von Einzelzellen

Aus Lymphknotengewebe von sechs Patienten mit klassischem Hodgkin-Lymphom wurden insgesamt 228 einzelne CD 30 positive H/RS Zellen sowie 104 normale Lymphozyten extrahiert. Negativkontrollen wurden parallel dazu unter denselben experimentellen Bedingungen in Form von Pufferproben mitgeführt (Abbildung 10).

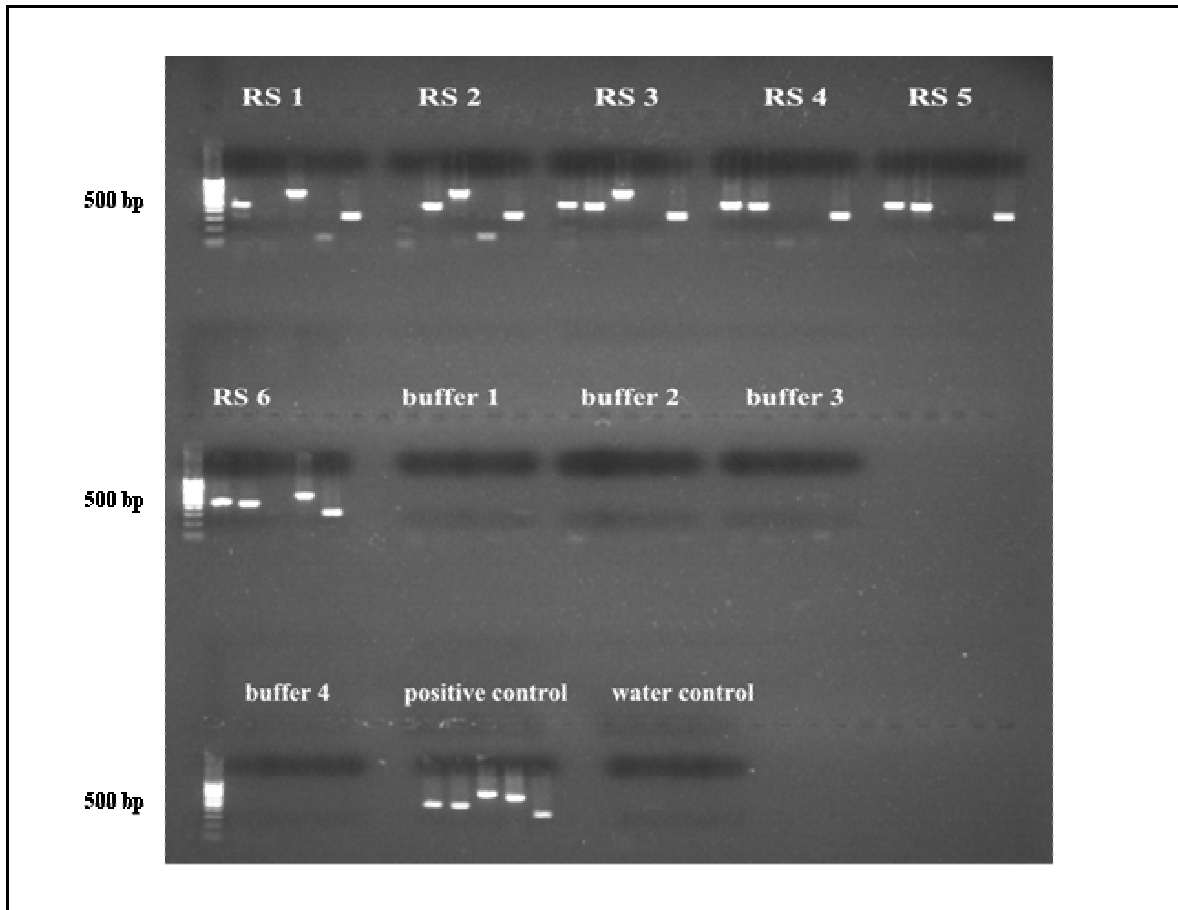


Abbildung 10: Gelelektrophorese einer Reamplifikation aus Einzelzellen. Gelegentlich war eine gleichzeitige Amplifikation aller Produkte aus einer H/RS Zelle aufgrund der Instabilität der DNA nicht möglich. RS = Reed-Sternberg Zelle; buffer = Pufferprobe; positive control = 10 ng DNA; negative control = Aqua dest.

Aus 52 H/RS Zellen konnten 194 spezifische Amplifikate sequenziert werden, die den gesamten kodierenden Bereich des Gens umfassten. Insgesamt wurden dadurch durchschnittlich acht Sequenzen jeder zu amplifizierenden Region ausgewertet, welche aus den Daten der Strang- und Gegenstrangsequenz zusammengesetzt waren (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse. H/RS = Reed/ Sternberg Zellen; Lymph = Lymphozyten; wt = Wildtyp; mut = Mutation; y = Pyrimidinaustausch; g = Guanodin; t = Thymin; c = Cytosin; a = Adenin; Die Anzahl der sequenzierten Amplifikate bezieht sich durch Schrägstriche abgetrennt auf die jeweilige Nummer des Amplifikats.

Fall Nr.	Anzahl extrahierter Zellen	Anzahl analysierter Zellen	Nr. des Amplifikats	Anzahl der sequenzierten Amplifikate	Art der Mutation	Allele
1	48 H/RS	9 H/RS	1/2/3/4/5	6/8/6/5/8	keine	
2	30 H/RS	7 H/RS	1/2/3/4/5	6/5/5/5/5	keine	
3	46 H/RS	14 H/RS	1/2/3	10/10/7	keine	
			4	5	5515t	mut/ mut
			5	10	keine	
	3 Pools à 8 Lymph.	24 Lymph.	4	3 Pools (24)	5515y	wt/ mut
4	66 H/RS	10 H/RS	1	9	1253a	mut/ mut
			2/3	6/5	keine	
			4	6	5515t	mut/ mut
			5	7	keine	
	9 Pools á 8 Lymph.	72 Lymph.	1	8 Pools (64)	1253g	wt/ wt
			4	6 Pools (48)	5515y	wt/ mut
5	16 H/RS	6 H/RS	1/2/3	5/6/6	keine	
			4	6	5515t	mut/ mut
			5	5	keine	
6	22 H/RS	6 H/RS	1/2/3	6/6/6	keine	
			4	6	5515y	wt/ mut
			5	6	keine	
	1 Pool á 8 Lymph.		4	1 Pool (8)	5515c	wt/ wt

Zunächst wurden nur Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen eines jeden Patientenfalls extrahiert und ihre DNA sequenziert. Zeigten sich in diesen Zellen Veränderungen der genomischen IκB-ε Sequenz, wurden von dem entsprechenden Fall zusätzlich normale Lymphozyten untersucht. Diese wurden in Gruppen zu je acht Zellen, sogenannten Pools, extrahiert und auch als Gruppe der Einzelzell-PCR zugeführt. Von allen Negativkontrollen wurden bei drei Proben Kontaminationen festgestellt (1,3%), so dass das gesamte Material dieser entsprechenden Extraktionen verworfen wurde und nicht in die Auswertung einging.

Von den untersuchten sechs Fällen wurde in einem Fall (Nr. 4) eine Mutation an Position 1253g→a (gtgagtat → gtgaat) entdeckt, was dem 5' Splicedonor (+ 5 Nukleotide) zwischen Intron 1 und Exon 1 entspricht. Es konnte in allen neun analysierten H/RS Zellen nur diese veränderte Sequenz und keine des Wildtyps nachgewiesen werden. Darüber hinaus war diese Mutation auf die H/RS Zellen dieses Falls restringiert, da die analysierten normalen umliegenden Lymphozyten (insgesamt 72 Zellen) aus denselben Gefrierschnitten allesamt ausschließlich den Wildtyp zeigten (Abbildung 11).

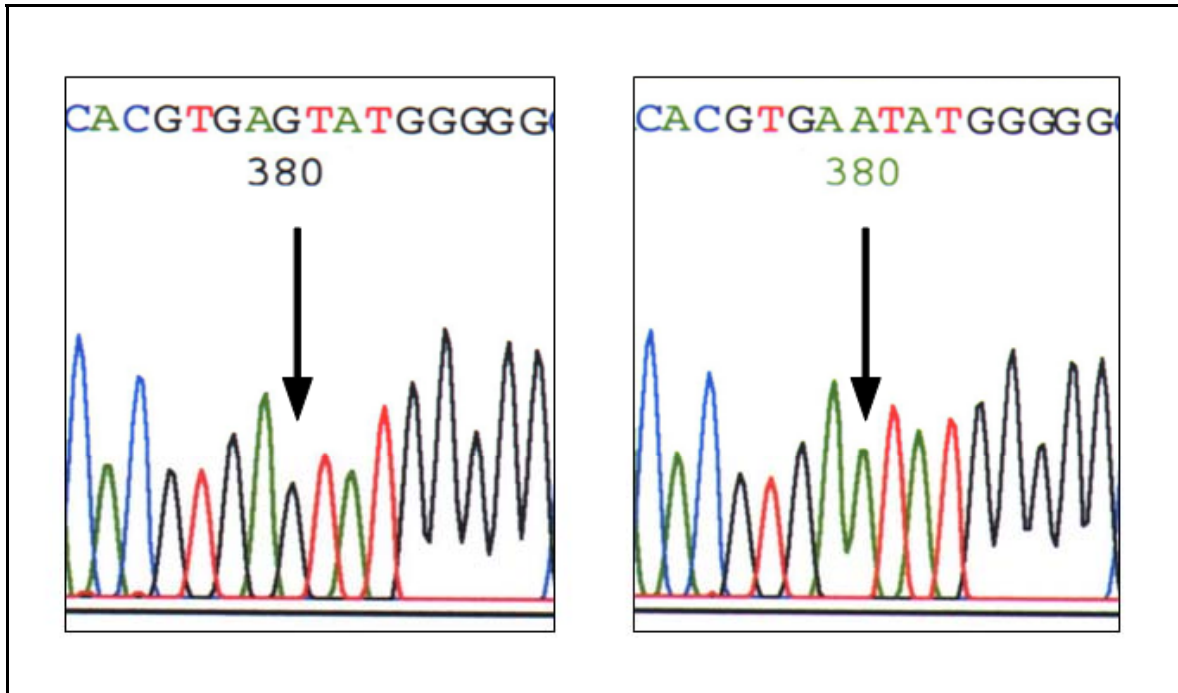


Abbildung 11: Elektrophänogramme der Sequenzierung des Falls Nr. 4. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Sequenz des 1. Amplifikats. Die Position 380 hier im Bild entspricht der Position 1253 der Gensequenz.

Links: Lymphozyten des Falls Nr. 4 zeigen die Wildtyp-Sequenz **Rechts: H/RS Zellen** des Falls Nr. 4 zeigen allesamt einen Einzelbasenaustausch an Position 1253g → a

Weiterhin konnte in demselben Fall (Nr. 4) und in drei weiteren Fällen (Nr. 3, 5 und 6) eine zusätzliche Sequenzalteration in Intron 4 an Position 5515c→t nachgewiesen werden, was einer Lokalisation + 27 Nukleotide stromabwärts vom 5'-Splicedonor entspricht. Diese Transitionsmutation an der Position 5515 stellte sich in den H/RS Zellen dreier Fälle (Nr. 3, 4 und 5) als homozygot und in denen eines Falls (Nr. 6) als heterozygot heraus. In den Lymphozyten der Fälle Nr. 3 und 4 waren sowohl der Wildtyp als auch die mutierte Sequenz nachweisbar. Die Lymphozyten des Falls Nr. 6 zeigten dagegen ausschließlich den Wildtyp.

4 DISKUSSION

4.1 BEDEUTUNG DER APOPTOSERESISTENZ FÜR H/RS ZELLEN

B-Lymphozyten mit fehlender Oberflächenexpression von Immunglobulinen fallen normalerweise während ihrer Entwicklung in lymphatischen Keimzentren dem programmierten Zelltod anheim. Die H/RS Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms, die aufgrund monoklonaler Umlagerungen der Immunglobulingene und somatischer Hypermutationen Post-Keimzentrums B-Zellen zugeordnet werden konnten, entkommen diesen Selektionsmechanismen trotz fehlender Immunglobulinexpression. Es müssen daher Mechanismen existieren, die zu einer Resistenz gegenüber der apoptotischen Selektion führen und damit essentiell für die Entwicklung und das Überleben von H/RS Zellen bzw. ihren Vorläuferzellen im Keimzentrum sind. Man nimmt dafür verschiedene Faktoren an, die alle im Zusammenspiel zur Entwicklung des cHL beitragen.

Es ist für H/RS Zellen ebenso typisch wie erstaunlich, dass sie trotz der genetischer Zuordnung zu der B-Zellreihe nicht den entsprechend typischen Phänotyp zeigen. Die fehlende

Immunglobulinexpression wird dabei auf ein nicht funktionstüchtiges

Transkriptionsfaktorrepertoire, welches in B-Zellen typischerweise aktiv ist, zurückgeführt. Dies betrifft zum einen Transkriptionsfaktoren wie Oct2, Bob.1/OBF.1 und PU.1, aber auch weiter im Signalweg abwärts gelegene Faktoren wie BLNK. [10, 19, 57] Es sind außerdem cHL Fälle beschrieben, in denen T-Zell typische Oberflächenmarker und eine gleichzeitige Umlagerung der Immunglobulingene in denselben H/RS Zellen nachgewiesen werden konnten. [11] Diese H/RS Zellen haben daher einen B-zellulären Ursprung, zeigen sich aber in der Immunphänotypisierung als T-Zellen. Sowohl die fehlende Ig-Expression, als auch das Erscheinen in nicht B-Zell typischen Phänotypen könnten H/RS Zellen im Sinne einer molekularen Tarnung (Mimicry) helfen, den Selektionsmechanismen zu entkommen.

Ein weiterer - auch im Sinne des molekularen „Mimicry“ - wichtiger Regulator der Tumorigenese stellt der Transkriptionsfaktor NOTCH1 dar, der im Wesentlichen für die Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen in die T- oder B-Zellreihe verantwortlich ist. NOTCH1 ist in H/RS Zellen des cHL stark exprimiert und wird durch die Interaktion mit dem dazugehörigen Liganden, Jagged1, welcher von umliegenden malignen und nicht malignen Zellen exprimiert wird, aktiviert. Dadurch erhalten die Tumorzellen einen enormen Proliferationsschub und zeigen sich gegen Apoptose resistent. [23] Darüber hinaus scheint NOTCH1 als ein Schlüsselmolekül für den diskrepanten T-zellulären Phänotyp von einigen H/RS Zellen verantwortlich zu sein, da durch eine NOTCH1 Aktivierung Gene supprimiert werden, die für die B-Zellentwicklung essentiell sind. [58]

Noch vor den bisher genannten Regulationsdefekten wurde allerdings die Dysregulation des NF- κ B Signalweges als ein gemeinsames Merkmal von H/RS Zellen des klassischen Hodgkin-

Lymphoms charakterisiert. Die damit einher gehende konstitutive Aktivierung von nukleärem NF- κ B ist für die Tumorentstehung und Apoptoseresistenz von außerordentlicher Bedeutung. [43]

4.2 MÖGLICHE URSACHEN FÜR KONSTITUTIV AKTIVIERTES NF- κ B

NF- κ B spielt eine zentrale Rolle bei Malignomen und ist ein Schlüsselmolekül für die Tumorentwicklung, Progression und Therapierbarkeit. Einige Tumoren sind schon in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung durch eine gesteigerte NF- κ B Aktivität charakterisiert, andere erwerben diese Eigenschaft erst im Verlauf - häufig durch eine Chemotherapie induziert, wogegen sie sich dann resistent zeigen. [59] Für das klassische Hodgkin-Lymphom wurde eine schon initial vorhandene NF- κ B Aktivierung in den Kernen der H/RS Zellen nachgewiesen. Sie ist für die Proliferation und das Überleben dieser Zellen essentiell, da eine Suppression der NF- κ B Aktivität zu einer massiv gesteigerten Apoptose führt. [43]

Die Aktivität von NF- κ B wird durch verschiedene Moleküle reguliert, zu denen der I κ B Kinase Komplex (IKK) und die Inhibitoren der I κ B Familie (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ) gehören. Prinzipiell sind verschiedene Mechanismen möglich, die zu einer erhöhten Aktivität beitragen können. Davon wurden bisher folgende beschrieben:

Eine Überaktivität des IKK führt zu einem verstärkten Abbau der I κ B Moleküle und dadurch zu einer Aktivierung von NF- κ B. [46]

Chromosomale Aberrationen können zu einer erhöhten Aktivierung NF- κ B relevanter Gene führen: Eine Amplifikation des REL Genlocus auf dem kurzen Arm des Chromosom 2, die zu einer verstärkten NF- κ B Aktivität beiträgt, wurde in HL Zelllinien nachgewiesen. [60]

NF- κ B wird nach einer Infektion mit einem Virus, das onkogenes Potential trägt, aktiviert: Zum Beispiel wurde für das durch das Epstein-Barr-Virus kodierte Latente Membran Protein 1 (LMP1) eine Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen. [61]

Durch Mutation oder Verlust von I κ B Molekülen wird NF- κ B nicht gehemmt und ist dadurch im Zellkern aktiv: Charakterisiert wurden bisher inaktivierende Mutationen des I κ B- α Gens, die sowohl in den Hodgkin Zelllinien L428 und KM-H2, als auch in primären H/RS Zellen von einigen Patienten nachgewiesen wurden, und zu einer konstitutiven NF- κ B Aktivierung beitrugen. [47, 48, 49]

Diese Erkenntnisse erklären den Befund der NF- κ B Aktivität jedoch nicht hinreichend, so dass weitere Regulationsdefekte vorhanden sein müssen. Aus Gründen, die im folgenden Abschnitt erläutert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit der NF- κ B Inhibitor I κ B- ϵ untersucht.

4.3 GRÜNDE FÜR DIE UNTERSUCHUNG DES I κ B- ϵ GENS

I κ B- ϵ wurde ursprünglich als Inhibitor beschrieben, der besonders die NF- κ B Untereinheiten p65 und cRel zu binden vermag, wohingegen seine Interaktion mit p50 und p52 schwächer scheint. [33] Demgegenüber stehen Beobachtungen, dass I κ B- ϵ eine Aktivität des Heterodimers p50/p65 vergleichbar effektiv hemmen kann wie I κ B- α . [34] Aufgrund der Tatsache, dass in H/RS Zellen vorwiegend p50/p65 Komplexe gefunden wurden, war es naheliegend, I κ B- ϵ in diesen Tumorzellen zu untersuchen. Auch die physiologischen Unterschiede der I κ B- ϵ Expression in verschiedenen Gewebetypen machten diesen Inhibitor zu einem interessanten Kandidaten: Im Gegensatz zu einer sehr viel geringeren Expression in T-Lymphozyten [34] wird I κ B- ϵ besonders in B-Lymphozyten exprimiert, am stärksten jedoch in transformierten B-Zellen. H/RS Zellen stammen fast immer von transformierten Keimzentrums B-Zellen ab.

Bei dem in unserer Arbeitsgruppe zuerst analysierten I κ B Isotyp, I κ B- α , konnten nicht in allen zehn cHL Fällen Mutationen nachgewiesen werden [47], weshalb sich die Vermutung ergab, dass sich Defekte unterschiedlicher I κ Bs in H/RS Zellen ergänzen. Daher wurden in dieser Arbeit dieselben Patientenfälle untersucht.

4.4 DISKUSSION DER METHODIK

Zu Beginn der Untersuchungen waren nur mRNA- und Proteindaten von I κ B- ϵ bekannt, welche aber aufgrund von Proteindegradation und der großen Instabilität von mRNA nicht für eine Analyse des I κ B- ϵ Moleküls in primären H/RS Zellen dienlich waren. Daher mußte zunächst die Gensequenz von I κ B- ϵ aufgeklärt werden, wozu eine humane DNA-Bibliothek benutzt wurde. Für die anschließende Einzelzellanalyse wurden sechs von den zehn Patientenfällen ausgewählt, die schon zuvor auf Mutationen des I κ B- α Gens untersucht worden waren – darunter auch der Fall mit bekannter I κ B- α Mutation. [47] Von diesen Fällen wurden gegen das CD30 Epitop immunhistochemisch gefärbte Gefrierschnitte eingesetzt, aus denen mit Hilfe von Mikromanipulatoren einzelne H/RS Zellen und normale Lymphozyten zur Kontrolle extrahiert werden konnten. Sofort nach der Extraktion wurden die Zellen proteolytisch verdaut und anschließend der Einzelzell-PCR zugeführt. Zur Kontrolle von Kontaminationen liefen in der PCR immer eine den Zellen entsprechende Anzahl von Pufferproben mit, die während der Zellextraktion entnommen wurden.

Wies eine der Pufferproben eine Kontamination auf, wurde die gesamte Ernte einer Extraktionssitzung verworfen. Insgesamt kam es bei 1,3% aller Amplifikationen zu Verunreinigungen. Da es sich bei der Einzelzell-PCR um eine Methode mit hoher Sensitivität handelt, war es für eine saubere Darstellung ebenso notwendig, während der Mikromanipulation einer Zelle die Umgebung nicht zu verletzen. Um solche Verunreinigungen zu erkennen, wurden für jeden cHL Fall zwischen 6 und 14 H/RS Zellen und – bei nachgewiesenen Sequenzalterationen – eine ebenso große Anzahl von normalen Lymphozyten ausgewertet.

Die ausgewerteten Sequenzen der einzelnen Amplifikate setzten sich immer aus den Daten der beiden Einzelstränge zusammen, die zu einer Konsensussequenz übereinandergelegt wurden. Hierdurch konnten Sequenzierungsungenauigkeiten insbesondere an den Enden der Stränge erkannt werden.

4.5 UNTERSCHIEDE DER KLONierten DNA ZUR BISHER BEKANNTEN I κ B- ϵ SEQUENZ

Durch die Klonierung des I κ B- ϵ Gens wurden im Vergleich mit der bis dato bekannten RNA Sequenz mehrere Abweichungen an den korrespondierenden Stellen gefunden. Diese sind am ehesten auf einen Polymorphismus der zugrunde liegenden DNA bzw. RNA zurückzuführen, da sich die resultierenden Aminosäuresequenzen funktionell nicht unterscheiden. Denn die im Vergleich größte veränderte Aminosäureabfolge im dritten Ankyrin Repeat (Exon 3) hat eine höhere Homologie zur Konsensussequenz für Ankyrin Repeats als die aus der RNA abgeleitete. Die beiden übrigen Alterationen einzelner Aminosäuren liegen außerhalb funktionell charakterisierter Proteinbereiche. Letztendlich hat ein Vergleich der hier klonierten I κ B- ϵ Gensequenz mit den nunmehr bekannten Daten des humanen Genomprojekts die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigt.

4.6 DAS I κ B- ϵ GEN IM VERGLEICH MIT I κ B- α

Das I κ B- ϵ Gen besteht aus sechs Exons und fünf Introns und ist damit der genomischen Struktur von I κ B- α sehr ähnlich. Im Gegensatz zu den insgesamt relativ kleinen Introns des I κ B- α Gens umspannen die Introns des I κ B- ϵ Gens Längen von 168 bis zu 2027 bp. Die Verteilung der die Ankyrin Repeats kodierenden Bereiche ist bis auf den für Ankyrin Repeat Nr. 4 nahezu identisch (Abbildung 12). Die funktionelle Charakterisierung von I κ B- ϵ im Vergleich mit anderen I κ B Isotypen findet sich an anderer Stelle. [33, 34, 35, 62]

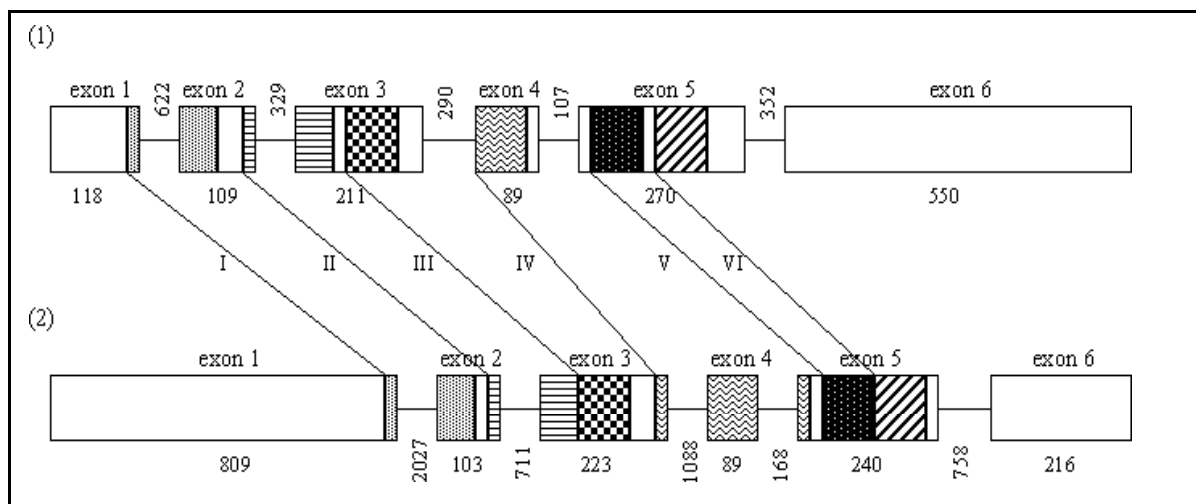


Abbildung 12: Vergleich des Aufbaus des I κ B- α Gens (1) mit dem des I κ B- ϵ Gens (2): Die Kästchen stellen die Exons dar, in denen die schraffierten Flächen die Ankyrin-Repeats symbolisieren (römische Zahlen). Die vertikal gedruckten Zahlen geben die Größe der Introns an, die horizontal die der Exons. Bedeutung von potentiellen Domänen für Transkriptionsfaktoren im nicht translatierten Bereich des I κ B- ϵ Gens

Über das translatierte 5'-Ende des Exon 1 hinaus konnte die Sequenz weiterer 420 Basen ermittelt werden, die der untranslatierten Region (UTR) des Gens entsprechen. In dieser 5'-UTR des Exon 1 konnten mehrere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Diese Daten wurden durch einen computergestützten Homologievergleich der experimentell gewonnenen Sequenzen mit bekannten Bindungsdomänen für Transkriptionsfaktoren gewonnen (TESS Programm). [56] Dadurch handelt es sich hier nur um einen theoretischen Hinweis auf mögliche Transskriptionsfaktorbindungsstellen, die durch experimentelle Analysen bestätigt werden müssen. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden nur solche Domänen beschrieben, die eine Homologie von 100% mit der eigentlichen Bindungskernsequenz aufzuweisen hatten. Vor dem Hintergrund der bekannten Regulation des NF- κ B Systems könnten Faktoren interessant sein, die in der zellulären Antwort auf Stress, Immunstimulation und Apoptoseresistenz eine Rolle spielen.

Besonders erwähnenswert scheinen daher in diesem Zusammenhang potentielle Bindungsstellen für die Untereinheit p50 des „nuclear factor kappa B“ (NF κ -B), das „activator protein 1“ (AP-1) und das „stimulating protein 1“ (SP-1), da für sie erhöhte Aktivitäten in H/RS Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms nachgewiesen wurden. [63, 64]

Eine transkriptionelle Regulation durch NF- κ B bzw. durch Interleukin 1, TNF- α , oder andere Stimulantien, die zu einer NF- κ B Aktivierung führen, wie sie für den Promotor des I κ B- α Gens beschrieben wurde[65], ist auch für das I κ B- ε Gen sehr wahrscheinlich, da I κ B- ε mRNA in YT-Zellen nach Stimulation mit diesen Molekülen verstärkt nachweisbar war. [34]

4.7 CHROMOSOMALE LAGE DES I κ B- ε GENS

Die FISH Analyse ergab für die Hybridisierung mit dem PAC Klon, der das I κ B- ε Gen in voller Länge enthielt, ein zentromernahes Signal auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, so dass aufgrund dieser Daten der Genlokus bei 6p11 angegeben wurde. Mittlerweile wurde jedoch durch das Fortschreiten des humanen Genomprojektes die gesamte Sequenz des Chromosom 6 veröffentlicht. [66] Aufgrund dieser Daten muß die Lage des I κ B- ε Gens auf 6p21.1 korrigiert werden. Zu finden ist der Genlokus in der Datenbank des Sanger Instituts (www.sanger.ac.uk) zwischen den Nukleotiden 44272774 - 44280355 bp (44.3 Mb) auf Chromosom 6.

4.7.1 Mögliche Bedeutung Genlokus 6p21 für eine Neoplasieentwicklung

Verschieden große chromosomale Veränderungen des kurzen Arms des Chromosom 6 wurden in soliden und hämatologischen Malignomen nachgewiesen. Gerade für den Lokus 6p21 wurden wiederkehrende chromosomale Aberration bei verschiedenen Neoplasien beschrieben. [67, 68, 69, 70] Dabei kann es sich zum Beispiel wie bei einigen B-Zell Lymphomen um eine Translokation handeln, die im Falle t(3;6)(q27;p21) zu einer Fusion des BCL6-Gens mit einem H4-Histon-Gen führt und eine Überexpression des BCL6 Proteins zur Folge hat. [67, 71]

Ebenso liegen auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21) die Gene für den Tumornekrosefaktor α (TNF- α), für Cyclin D3 und für die des HLA-Komplexes. Die Lage des Gens für Cyclin D3 bei 6p21.1 wirft interessante Fragen auf, da eine Translokation von t(6;14)(p21.1;q32.3) als ein zwar nicht häufiges, jedoch wiederkehrendes Merkmal von einigen B-Zell Lymphomen und dem Multiplen Myelom beschrieben wurde. [72] Eine hohe Cyclin D3 Expression auf RNA und Protein Ebene wurde dabei in Fällen von reifen B-Zell Neoplasien mit der t(6;14) Translokation nachgewiesen. [73]

Es scheint darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen Alterationen bei 6p21 und dem Hodgkin-Lymphom zu geben. Eine Chromosomenanalyse bei der Hodgkin generierten Zelllinie L1236 zeigte zwischen 6p21 und 6p22 große Abschnitte mit einem Heterozygotieverlust (LOH). [74] Zwischen 6p21 und 6p22 liegen unter anderem die kodierenden Abschnitte des HLA Komplexes. Ein partieller oder kompletter Verlust des HLA Haplotyps könnte einen Überlebensvorteil für H/RS Zellen bedeuten, was für andere Tumorentitäten bereits nachgewiesen wurde. [75]

Ebenso wäre eine Beteiligung des I κ B- ϵ Gens an der Tumorigenese von L1236 Zellen denkbar, da der beschriebene LOH tragende Chromosomenabschnitt groß ist und damit viele Gene umfassen kann. Eine konkretere Angabe ist aber eben aufgrund der Ausdehnung des LOH Bereichs kaum möglich. Weitere Untersuchungen kleinerer Teilabschnitte des Chromosomenarms 6p mit feineren Methoden sind hierzu ebenso notwendig wie die Bestätigung der Spezifität der LOH zwischen 6p21 und 6p22 in kultivierten L1236 H/RS Zellen, da es sich auch um Phänomene chromosomaler Instabilität oder Zellkulturartefakte handeln könnte.

Aufgrund des relativ häufigen Nachweises von 6p21 Alterationen bei verschiedenen Neoplasien wäre eine Beteiligung des I κ B- ϵ Gens jedoch auch bei anderen Tumorentitäten als dem Hodgkin-Lymphom möglich.

4.8 BEDEUTUNG EINER EPSTEIN-BARR-VIRUS INFEKTION IM UNTERSUCHTEN MATERIAL

Es ist bekannt, dass in industrialisierten Ländern ca. 40% aller klassischen Hodgkin-Lymphome Epstein-Barr-Virus (EBV) positiv sind und H/RS Zellen dieser Patienten das latente Membran Protein 1 (LMP1) exprimieren. LMP1 selbst kann NF- κ B über einen erhöhten Umsatz von I κ B- α aktivieren. [61] In wieweit eine Assoziation von EBV mit cHL wirklich ursächlich oder krankheitsfördernd ist, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. In Industrieländern kommt der nodulär sklerosierende Subtyp insgesamt am häufigsten vor und wird vor allem bei jungen Erwachsenen der Altersklasse von 15 bis 24 Jahre angegeben. Die höchste Assoziationsrate des cHL mit einer EBV Infektion liegt jedoch bei Kindern und älteren Erwachsenen, also jenseits des cHL Inzidenzhöhepunktes. [76] Die Deutung dieser diskrepanten Befunde wird allerdings im Licht der Fehleranfälligkeit des immunhistochemischen LMP1 Nachweises kritisch gesehen. [77]

In Bezug auf die Patientenfälle, die in dieser Arbeit untersucht wurden, scheint eine EBV Infektion nicht von erster Bedeutung zu sein. Auf den H/RS Zellen des Patienten mit der nachgewiesenen Mutation im I κ B- α zeigte sich keine LMP1 Expression, wohingegen bei den Tumorzellen des cHL Patienten mit einer Mutation im I κ B- ϵ Gen eine LMP1 Expression nachgewiesen werden konnte. Insgesamt waren fünf von sechs Fällen LMP1 negativ, daher kann hier EBV nicht die alleinige Ursache für eine NF- κ B Aktivierung sein.

4.9 MUTATIONEN DES I κ B- ϵ GENS IN EINZELZELLEN

Die Analyse des I κ B- ϵ Gens in primären H/RS Zellen ergab in vier Fällen eine Einzelbasensubstitution in Intron 5 (5515C \rightarrow T). Da diese Alteration in einer Region des Introns auftrat, die bisher nicht weiter funktionell charakterisiert wurde, und darüber hinaus auch in den zugehörigen normalen Lymphozyten nachzuweisen war, wurde sie am ehesten als ein Polymorphismus des I κ B- ϵ Gens gedeutet. Bemerkenswert erscheint jedoch die Tatsache, dass dieser Basenaustausch in vier der sechs Fälle nachzuweisen war und damit innerhalb des Kollektivs häufig auftrat. Ob es sich dabei um eine zufällige Akkumulation handelte, oder einen Hinweis auf tatsächlich funktionelle Relevanz gab, lässt sich aufgrund der kleinen Zahl der untersuchten Individuen im Rahmen dieser Untersuchung nicht beantworten.

In den H/RS Zellen des Falls Nr. 4 wurde jedoch eine Punktmutation am 5'-Ende des ersten Introns nachgewiesen (1253G \rightarrow A). Nur diese mutierte Sequenz konnte in den Tumorzellen mittels Einzelzell-PCR amplifiziert werden. Dafür gibt es verschiedene Erklärungen: Es könnte aus technischen Gründen nicht möglich gewesen sein, beide Allele zu amplifizieren, weil es beispielsweise zu einer Teilung des großen Kerns der analysierten H/RS Zelle beim Anfertigen des

Gewebsschnitts gekommen war. Die generell recht hohe Instabilität der DNA in primären Zellen trug zusätzlich sicherlich nicht zu optimalen Analysebedingungen bei. Durch die mitgeführten Kontrollen und eine genügend große Anzahl der untersuchten Zellen sind jedoch diese Erklärungsmöglichkeiten unwahrscheinlich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in den H/RS Zellen dieses Falles ausschließlich mutierte Allele des $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ Gens vorhanden waren, oder das Wildtypallel deletiert war. Diese Erklärung wird zudem durch den Befund unterstützt, dass alle normalen Lymphozyten aus diesem Gewebe ausschließlich den Wildtyp aufwiesen. Die gefundene Mutation (1253G→A) ist damit als tumorzellspezifisch zu werten.

4.9.1 Mögliche funktionelle Auswirkung der Mutation (1253G→A)

Durch die Einzelbasensubstitution an der 5'Splicestelle (+5 Nukleotide) zwischen Intron 1 und Exon 1 (1253G→A) kommt es höchstwahrscheinlich zu einem gestörten Splicevorgang. Bei Untersuchungen defekter humaner U1 snRNA wurden analog zu der hier gefundenen Mutation Veränderungen beschrieben, die zu einem Abbruch des Splicevorgangs führten. [78] Der Splicedefekt führte dabei entweder zu einem Erhalt des flankierenden Introns in der mRNA, oder ein Exon wurde deletiert. In beiden Fällen kam es zu einem vorzeitigen Abbruch des darauf folgenden Translationsprozesses, da ein präterminales Stopkodon in das Leseraster gerückt war. Somit war das resultierende Protein stark trunkiert und funktionslos.

Ein entsprechend trunkiertes $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ Protein wäre funktionslos, da die hier vorliegende Mutation noch vor allen kodierenden Abschnitten für die Ankyrin Repeats liegt, und diese somit nicht mehr im Protein enthalten wären. (Abbildung 13) Es wurde gezeigt, dass für die physikalische Interaktion zwischen $\text{I}\kappa\text{B}$ und $\text{NF-}\kappa\text{B}$ intakte Ankyrin Repeats essentiell sind. [62] Somit wäre das erwartete trunkierte $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ Protein nicht mehr in der Lage, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ zu binden. Die Tatsache, dass die gefundene Splicemutation ausschließlich in H/RS Zellen auftritt, legt die Annahme nahe, dass eine Verbindung zur Entwicklung des cHL bei diesem Patienten besteht. Mutationen dieser Art wurden darüber hinaus für verschiedene Tumorsuppressorgene wie zum Beispiel dem Ataxia-teleangiektasia-Gen im Mantelzell Lymphom [79] und für das p53 Gen bei chronisch lymphatischer B-Zell Leukämie [80] beschrieben.

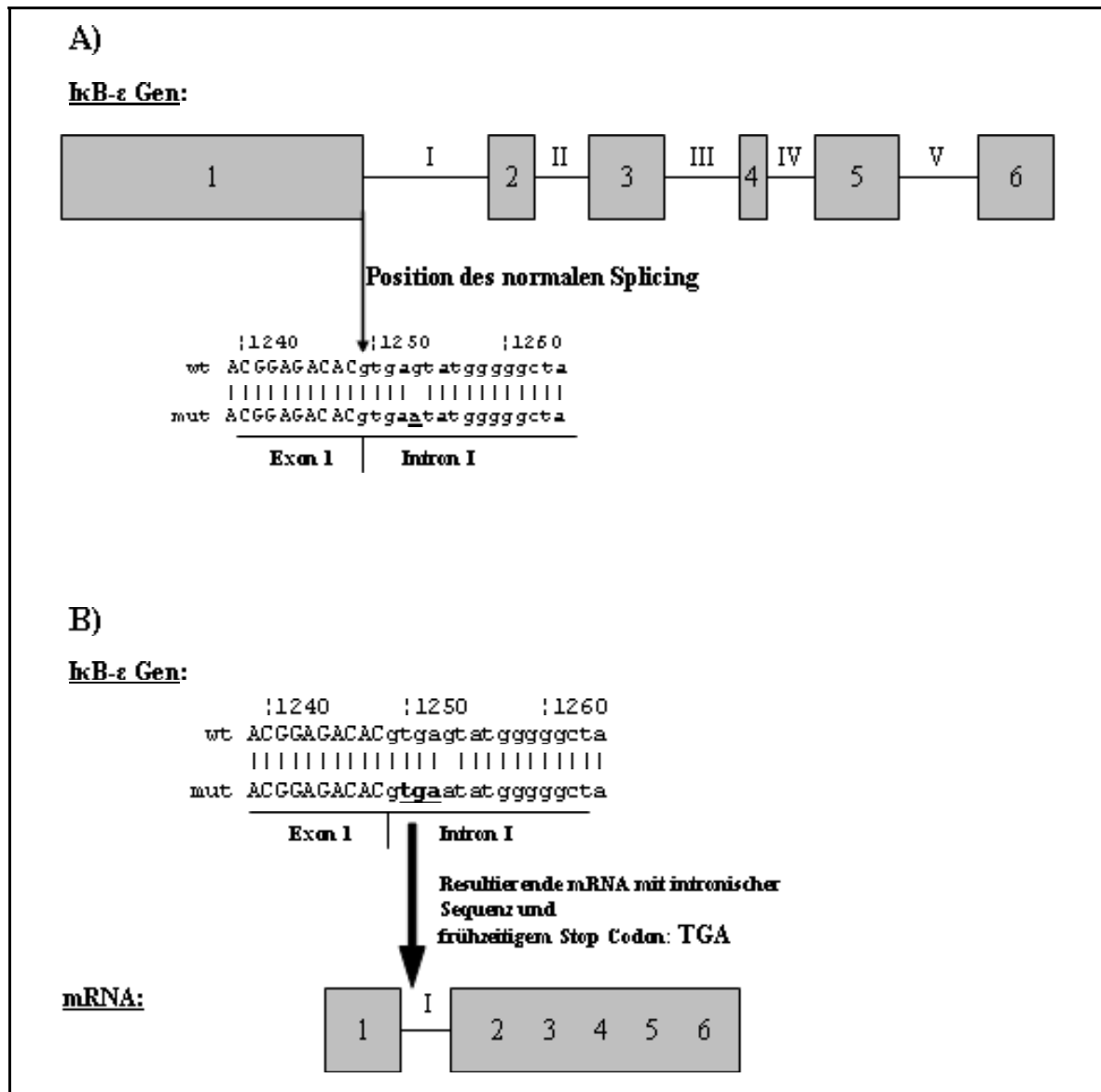


Abbildung 13: Mögliche Veränderungen des Splice-Vorgangs zwischen Exon 1 und Intron I. Exons des Gens sind als Kästchen dargestellt und arabisch nummeriert. Dazwischen liegen als Strecken die Introns mit römischen Ziffern. Die Nukleotidpositionen richten sich nach der Gensequenz AF261937. Exons = Großbuchstaben; Introns = Kleinbuchstaben wt = Wildtyp Sequenz; mut = mutierte Sequenz **A)** Normales Splicing erfolgt zwischen 1248C und 1249g. Die Punktmutation 1253g → a ist unterstrichen. **B)** Das Splicing unterbleibt zwischen den Positionen 1248 / 1249, so dass die Sequenz des Intron I in der resultierenden mRNA enthalten ist. Bei späterer Translation der mRNA ergibt sich ein vorzeitiges Stopkodon 1250TGA, was zu einem stark verkürzten Protein führen kann.

4.9.2 Diskussion der Bedeutung eines I κ B- ϵ Defekts in H/RS Zellen

In der Einleitung dieser Arbeit wurde zur Frage nach einer funktionellen Redundanz bzw. Komplementarität der I κ B Isoproteine festgestellt, dass eine eindeutige Beantwortung derzeit nicht möglich ist. Es gibt jedoch Hinweise auf Besonderheiten der einzelnen Isotypen.

Die physiologische Rolle von I κ B- ϵ wurde hauptsächlich durch Knockout Experimente (KO) untersucht. Im Gegensatz zu einem KO von I κ B- α führte der komplette Ausfall von I κ B- ϵ nicht zu einem letalen Phänotyp oder einer stark gesteigerten NF- κ B Aktivität, wie dies bei I κ B- α defizienten Mäusen der Fall war. Jedoch wurden bei I κ B- ϵ KO Mäusen neben einer konstitutiven Überexpression der NF- κ B gesteuerten Zytokine Il-1 α , Il-1 β , Il-1Ra und Il-6 auch erhöhte Konzentrationen von IgM und IgG1 gemessen. [35] Dies kann ein Hinweis auf eine inhibitorische Rolle für die Expression dieser Zytokine und Immunglobuline vorwiegend durch I κ B- ϵ sein, was durch den Befund unterstützt wird, dass Mäusen mit einem Knockout des I κ B- α Gens eine Expression eben dieser Zytokine (Il-1 α , Il-1 β , Il-1Ra und Il-6) fehlt. [81] In Bezug auf die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms könnten damit bei einem Ausfall von I κ B- ϵ H/RS Zellen durch diese Zytokine auto- oder parakrin proliferativ stimuliert werden.

Mutationen des I κ B- ϵ Gens wurden nicht nur in Einzelzellen nachgewiesen, sondern darüber hinaus auch in den Tumorzellen der Hodgkin Zelllinie L428. Es zeigte sich dort eine Deletion von vier Basenpaaren in Exon 1 des I κ B- ϵ Gens, die zu einem präterminalen Stop der Translation führte. Es war kein I κ B- ϵ Protein in diesen Zellen nachweisbar. [82] Auch hierdurch wird eine Bedeutung von I κ B- ϵ für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms unterstützt, indem neben dem erneuten Mutationsbefund auch ein absoluter I κ B- ϵ Proteinmangel in H/RS Zellen nachgewiesen werden konnte, was in der Einzelzellanalyse aus technischen Gründen nicht möglich war.

Für die Bewertung der Rolle von I κ B- ϵ für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms sollte auch die Kinetik des Moleküls betrachtet werden, und dies aus zwei Gründen:

Mäuse mit einem I κ B- ϵ Knockout wurden nur 4 bis maximal 12 Wochen nach der Geburt beobachtet und analysiert. [35] Dadurch könnten aufgrund des bekannten langsamen Umsatzes des I κ B- ϵ Proteins mögliche Spätfolgen einer I κ B- ϵ Defizienz im Sinne einer möglichen Krankheitsprädisposition unentdeckt geblieben sein.

Mit Hilfe von Experimenten, in denen Zellen nur einen einzelnen I κ B Isotyp exprimieren konnten, wurde die Dynamik der intrazellulären NF- κ B Konzentration in Reaktion auf einen einzelnen und einen transienten TNF α Stimulus untersucht. Dabei zeigte sich, dass die I κ B Isotypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten spezifische Aufgaben wahrnehmen. In Zellen mit einer ausschließlichen I κ B- α Expression war eine schnelle Erhöhung der intrazellulären NF- κ B

Konzentration nach einem einzelnen TNF α Stimulus messbar, wobei diese starken Oszillationen mit hohen Amplituden unterlegen war. Diese NF- κ B Oszillationen hielten über den Messzeitraum fast ungebremst an. Waren die Zellen jedoch in der Lage, jeweils nur I κ B- ϵ oder β zu exprimieren, führte dies zu einer NF- κ B Aktivierung auf gleich bleibend hohem Niveau ohne Oszillationen. Eine kombinierte Expression von I κ B- α mit β oder ϵ ergab gedämpfte Oszillationen, bei der sich die NF- κ B Aktivierung auf ein mittleres Niveau mit minimalen Amplituden einstellte.[83] I κ B- ϵ und β sind also in der Lage, starke NF- κ B Konzentrationsschwankungen abzufedern und auf ein Mittelmaß einzustellen. Unter physiologischen Bedingungen kommen hohe NF- κ B Oszillationen nicht vor und scheinen auf Dauer einen ausgeprägten Zellstress zu verursachen. [83] Ebenso konnten je nach der Art der NF- κ B Aktivierung - d.h. entweder in Form starker Oszillationen, oder einer kontinuierlichen Aktivität auf mittlerem Niveau – jeweils andere Genexpressionsmuster nachgewiesen werden. [84] So gibt es Gene wie z.B. das Chemokin IP-10, die durch eine kurze NF- κ B Aktivitätserhöhung exprimiert werden. Wiederum andere, wie z.B. RANTES, erreichen erst nach kontinuierlicher NF- κ B Aktivität ihr Expressionsoptimum. [83]

Aus den genannten Untersuchungen über die I κ B Isoformen α , β und ϵ mit kombinierten Defekten lässt sich folgern, dass die anfängliche Vermutung einer Funktionsüberlappung der Isoformen nur zum Teil richtig ist. Vielmehr gibt es sowohl redundante, d.h. kompensierbare Funktionen, als auch solche, die für einen Isotyp spezifisch sind und damit nicht ersetzbar. [85]

Diese Beobachtungen sind aber auch im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit interessant, da ein Fehlen von I κ B- ϵ in H/RS Zellen zu einer ungedämpften NF- κ B Oszillierung führen könnte und dadurch der zelluläre Stress im Sinne einer Daueraktivierung erhöht würde. Auch das durch die Qualität der NF- κ B Aktivierung veränderte Genexpressionsmuster wäre in diesem Zusammenhang bei H/RS Zellen zu untersuchen und könnte weiteren Aufschluss über die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms geben. Weiterhin wird die Frage nach der Bedeutung von I κ B- β für die Pathogenese des cHL ist in diesem Zusammenhang aufgeworfen, da Hoffmann et al. eine synergistische Wirkung von I κ B- β und I κ B- ϵ bei der Oszillationsdämpfung zeigen konnten. Bei einem funktionellen Knockout von I κ B- ϵ in H/RS Zellen wäre bei einer sonst intakten Signaltransduktion des NF- κ B Weges nach den bislang bekannten Daten nur noch I κ B- β in der Lage, die NF- κ B Oszillationen zu dämpfen.

4.10 FAZIT UND AUSBLICK

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sechs Fälle des klassischen Hodgkin-Lymphoms auf Einzelzellebene untersucht. Hierbei konnte zum ersten Mal eine biallelische Mutation des $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ Gens in einem dieser Fälle nachgewiesen werden, die nach Datenlage zu einem Funktionsausfall des Genproduktes führen dürfte. In einem weiteren Fall war in früheren Untersuchungen eine Mutation des $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Gens mit Funktionsverlust gezeigt worden. Außerdem konnte eine genomische Mutation des $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ Gens in Zellen der Linie L 428 nachgewiesen werden. Bei diesen Zellen fand sich kein $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ Protein. Somit scheinen aberrante $\text{I}\kappa\text{B}$ Proteine in H/RS Zellen häufiger vorzukommen als bisher bekannt. Aufgrund der kleinen Zahl der hier untersuchten Fälle muss jedoch die Frage nach der Signifikanz des Vorkommens von dysfunktionalem $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ in H/RS Zellen an dieser Stelle offen bleiben. Weiterhin dürften für die konstitutive Aktivierung von NF- κB neben noch nicht untersuchten $\text{I}\kappa\text{B}$ Isotypen auch andere Moleküle in Frage kommen, die im oberen Teil der Signalkaskade des NF- κB Systems agieren.

Festzuhalten ist darüber hinaus, dass $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ durch seine kinetischen Eigenschaften eine prädominante Rolle bei der Regulation bestimmter Gene einnimmt und zusammen mit $\text{I}\kappa\text{B-}\beta$ für eine Dämpfung hoher intrazellulärer Konzentrationsamplituden von NF- κB sorgt. Entsprechend regulierte Genprodukte wie Zytokine könnten stimulierend auf das Wachstum von H/RS Zellen, bei denen $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ funktionslos ist, wirken. Ausserdem wäre eine Prädisposition zur malignen Transformation bei Zellen zu diskutieren, die durch dauerhaft hohe intrazelluläre Konzentrationsamplituden von NF- κB stimuliert werden.

Der Nachweis der chromosomalen Lokalisation des $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ Gens bei 6p21.1 wirft Fragen nach einer pathophysiologischen Beteiligung dieses Abschnitts bei weiteren Neoplasien auf, bei denen das NF- κB System dereguliert ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hodgkin und Reed-Sternberg (H/RS) Zellen sind die Tumorzellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) und stammen in den meisten Fällen von Keimzentrums B-Zellen, sehr selten von T-Zellen ab. Als einen zentralen Mechanismus für die zelluläre maligne Transformation und Apoptoseresistenz von H/RS Zellen konnte eine deregulierte, konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in H/RS Zellkernen nachgewiesen werden. Die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B wird durch spezifische Inhibitoren, I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ und I κ B- ϵ , reguliert. Jüngst konnte ein Defekt des I κ B- α Gens im Primärmaterial eines Patienten mit cHL und in zwei Hodgkin Zelllinien nachgewiesen werden.

I κ B- ϵ als ein weiterer wichtiger Regulator der NF- κ B Aktivität hat in murinen Zellen eine hohe Affinität zur NF- κ B Untereinheit p65, welche in H/RS Zellen insbesondere als Heterodimer p50/p65 vorkommt.

In dieser Arbeit wurde das humane I κ B- ϵ Gen kloniert und auf Mutationen in primären Tumorzellen untersucht. Das Primärmaterial stammte aus denselben sechs Patientenfällen, die schon zuvor auf Mutationen des I κ B- α Gens untersucht worden waren.

Das I κ B- ϵ Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21.1) und ist strukturell eng mit den anderen I κ B Molekülen verwandt.

In primären H/RS Zellen eines Patienten wurde eine homozygote Mutation an der 5'- Splicesite des Intron 1 gefunden. Diese Mutation war spezifisch für H/RS Zellen dieses Falls, und normale reaktive Lymphozyten wiesen ausschließlich den Wildtyp auf.

In Zusammenschau mit den bisher identifizierten Defekten des I κ B/ NF- κ B Systems zeigen diese Ergebnisse, dass dysfunktionelle NF- κ B Inhibitoren bei einem Teil der cHL Fälle zu einer Fehlregulation von NF- κ B führen können und damit für die zelluläre Pathophysiologie von Bedeutung sind.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Foss, H. D.; Marafioti, T. and Stein, H. (2000): [Hodgkin lymphoma. Classification and pathogenesis], *Pathologie* (vol. 21), No. 2, pp. 113-23.
- [2] Cossman, J.; Messineo, C. and Bagg, A. (1998): Reed-Sternberg cell: survival in a hostile sea, *Lab Invest* (vol. 78), No. 3, pp. 229-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9520936
- [3] Hansmann, M. L. and Willenbrock, K. (2002): [WHO classification of Hodgkin's lymphoma and its molecular pathological relevance], *Pathologie* (vol. 23), No. 3, pp. 207-18. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12089788>
- [4] Mason, D. Y.; Banks, P. M.; Chan, J.; Cleary, M. L.; Delsol, G.; de Wolf Peeters, C.; Falini, B.; Gatter, K.; Grogan, T. M.; Harris, N. L. and et al. (1994): Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity, *Am J Surg Pathol* (vol. 18), No. 5, pp. 526-30. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8172327>
- [5] Stein, H.; Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Mason, D. Y.; Ziegler, A.; Schienle, W. and Diehl, V. (1982): Identification of Hodgkin and Sternberg-reed cells as a unique cell type derived from a newly-detected small-cell population, *Int J Cancer* (vol. 30), No. 4, pp. 445-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6754630
- [6] Durkop, H.; Latza, U.; Hummel, M.; Eitelbach, F.; Seed, B. and Stein, H. (1992): Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease, *Cell* (vol. 68), No. 3, pp. 421-7.
- [7] Thomas, R. K.; Re, D.; Wolf, J. and Diehl, V. (2004): Part I: Hodgkin's lymphoma--molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Lancet Oncol* (vol. 5), No. 1, pp. 11-8.

- [8] Braeuninger, A.; Kuppers, R.; Strickler, J. G.; Wacker, H. H.; Rajewsky, K. and Hansmann, M. L. (1997): Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 17, pp. 9337-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9256483>
- [9] Stein, H. and Hummel, M. (1999): Cellular origin and clonality of classic Hodgkin's lymphoma: immunophenotypic and molecular studies., *Seminars in Hematology* (vol. 36), No. 3, pp. 233-41. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.10462323>
- [10] Marafioti, T.; Hummel, M.; Foss, H. D.; Laumen, H.; Korbjuhn, P.; Anagnostopoulos, I.; Lammert, H.; Demel, G.; Theil, J.; Wirth, T. and Stein, H. (2000): Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription, *Blood* (vol. 95), No. 4, pp. 1443-50. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10666223>
- [11] Seitz, V.; Hummel, M.; Marafioti, T.; Anagnostopoulos, I.; Assaf, C. and Stein, H. (2000): Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease., *Blood* (vol. 95), No. 10, pp. 3020-4. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.10807764>
- [12] Kadin, M. E.; Drews, R.; Samel, A.; Gilchrist, A. and Kocher, O. (2001): Hodgkin's lymphoma of T-cell type: clonal association with a CD30+ cutaneous lymphoma, *Hum Pathol* (vol. 32), No. 11, pp. 1269-72.
- [13] Seitz, V.; Hummel, M.; Walter, J. and Stein, H. (2003): Evolution of classic Hodgkin lymphoma in correlation to changes in the lymphoid organ structure of vertebrates., *Developmental and Comparative Immunology* (vol. 27), No. 1, pp. 43-53. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.12477500>
- [14] Defrance, T.; Casamayor-Palleja, M. and Krammer, P. H. (2002): The life and death of a B cell, *Adv Cancer Res* (vol. 86), pp. 195-225. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12374279

- [15] Muschen, M.; Re, D.; Brauninger, A.; Wolf, J.; Hansmann, M. L.; Diehl, V.; Kuppers, R. and Rajewsky, K. (2000): Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Cancer Res* (vol. 60), No. 20, pp. 5640-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11059754>
- [16] Thomas, R. K.; Kallenborn, A.; Wickenhauser, C.; Schultze, J. L.; Draube, A.; Vockerodt, M.; Re, D.; Diehl, V. and Wolf, J. (2002): Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Am J Pathol* (vol. 160), No. 4, pp. 1521-8.
- [17] Mathas, S.; Lietz, A.; Anagnostopoulos, I.; Hummel, F.; Wiesner, B.; Janz, M.; Jundt, F.; Hirsch, B.; Johrens_Leder, K.; Vornlocher, H.P.; Bommert, K.; Stein, H. and Dorken, B. (2004): c-FLIP Mediates Resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg Cells to Death Receptor-induced Apoptosis., *The Journal of Experimental Medicine* (vol. 199), No. 8, pp. 1041-52. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.15078899>
- [18] Kuppers, R. (2002): Molecular biology of Hodgkin's lymphoma, *Adv Cancer Res* (vol. 84), pp. 277-312. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11883530>
- [19] Stein, H.; Marafioti, T.; Foss, H. D.; Laumen, H.; Hummel, M.; Anagnostopoulos, I.; Wirth, T.; Demel, G. and Falini, B. (2001): Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription, *Blood* (vol. 97), No. 2, pp. 496-501.
- [20] Re, D.; Muschen, M.; Ahmadi, T.; Wickenhauser, C.; Staratschek-Jox, A.; Holtick, U.; Diehl, V. and Wolf, J. (2001): Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells, *Cancer Res* (vol. 61), No. 5, pp. 2080-4.
- [21] Theil, J.; Laumen, H.; Marafioti, T.; Hummel, M.; Lenz, G.; Wirth, T. and Stein, H. (2001): Defective octamer-dependent transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells, *Blood* (vol. 97), No. 10, pp. 3191-6.
- [22] Ushmorov, A.; Ritz, O.; Hummel, M.; Leithauser, F.; Moller, P.; Stein, H. and Wirth, T. (2004): Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression, *Blood*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15284123

- [23] Jundt, F.; Anagnostopoulos, I.; Forster, R.; Mathas, S.; Stein, H. and Dorken, B. (2002): Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma., *Blood* (vol. 99), No. 9, pp. 3398-403. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.11964309>
- [24] Bargou, R. C.; Leng, C.; Krappmann, D.; Emmerich, F.; Mapara, M. Y.; Bommert, K.; Royer, H. D.; Scheidereit, C. and Dorken, B. (1996): High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *Blood* (vol. 87), No. 10, pp. 4340-7.
- [25] Gaur, U. and Aggarwal, B. B. (2003): Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily, *Biochem Pharmacol* (vol. 66), No. 8, pp. 1403-8.
- [26] Bash, J.; Zong, W. X.; Banga, S.; Rivera, A.; Ballard, D. W.; Ron, Y. and Gelinas, C. (1999): Rel/NF-kappaB can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors, *Embo J* (vol. 18), No. 10, pp. 2803-11.
- [27] Bottex-Gauthier, C.; Pollet, S.; Favier, A. and Vidal, D. R. (2002): [The Rel/NF-kappa-B transcription factors: complex role in cell regulation], *Pathol Biol (Paris)* (vol. 50), No. 3, pp. 204-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11980335>
- [28] Mercurio, F. and Manning, A. M. (1999): Multiple signals converging on NF-kappaB, *Curr Opin Cell Biol* (vol. 11), No. 2, pp. 226-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10209157
- [29] Whiteside, S. T. and Israel, A. (1997): I kappa B proteins: structure, function and regulation, *Semin Cancer Biol* (vol. 8), No. 2, pp. 75-82.
- [30] Yamazaki, S.; Muta, T. and Takeshige, K. (2001): A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 29, pp. 27657-62.
- [31] Haskill, S.; Beg, A. A.; Tompkins, S. M.; Morris, J. S.; Yurochko, A. D.; Sampson-Johannes, A.; Mondal, K.; Ralph, P. and Baldwin, A. S., Jr. (1991): Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity, *Cell* (vol. 65), No. 7, pp. 1281-9.

- [32] Lee, J. W.; Choi, H. S.; Gyuris, J.; Brent, R. and Moore, D. D. (1995): Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor, *Mol Endocrinol* (vol. 9), No. 2, pp. 243-54.
- [33] Whiteside, S. T.; Epinat, J. C.; Rice, N. R. and Israel, A. (1997): I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity, *Embo J* (vol. 16), No. 6, pp. 1413-26. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9135156>
- [34] Li, Z. and Nabel, G. J. (1997): A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription, *Mol Cell Biol* (vol. 17), No. 10, pp. 6184-90. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9315679>
- [35] Memet, S.; Laouini, D.; Epinat, J. C.; Whiteside, S. T.; Goudeau, B.; Philpott, D.; Kayal, S.; Sansonetti, P. J.; Berche, P.; Kanellopoulos, J. and Israel, A. (1999): IkappaBepsilon-deficient mice: reduction of one T cell precursor subspecies and enhanced Ig isotype switching and cytokine synthesis, *J Immunol* (vol. 163), No. 11, pp. 5994-6005. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10570287>
<http://www.jimmunol.org/v163n11/5994/5994-abs-frame.html>
- [36] Simeonidis, S.; Liang, S.; Chen, G. and Thanos, D. (1997): Cloning and functional characterization of mouse IkappaBepsilon, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 26, pp. 14372-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9405619>
- [37] Beg, A. A.; Sha, W. C.; Bronson, R. T. and Baltimore, D. (1995): Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice, *Genes Dev* (vol. 9), No. 22, pp. 2736-46.
- [38] Klement, J. F.; Rice, N. R.; Car, B. D.; Abbondanzo, S. J.; Powers, G. D.; Bhatt, P. H.; Chen, C. H.; Rosen, C. A. and Stewart, C. L. (1996): IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 5, pp. 2341-9.
- [39] Richmond, A. (2002): Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth, *Nat Rev Immunol* (vol. 2), No. 9, pp. 664-74.

- [40] Baldwin, A. S. (2001): Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB, *J Clin Invest* (vol. 107), No. 3, pp. 241-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11160144>
- [41] Wang, C. Y.; Cusack, J. C., Jr.; Liu, R. and Baldwin, A. S., Jr. (1999): Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB, *Nat Med* (vol. 5), No. 4, pp. 412-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10202930
- [42] Kaltschmidt, C.; Kaltschmidt, B.; Neumann, H.; Wekerle, H. and Baeuerle, P. A. (1994): Constitutive NF-kappa B activity in neurons, *Mol Cell Biol* (vol. 14), No. 6, pp. 3981-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8196637
- [43] Bargou, R. C.; Emmerich, F.; Krappmann, D.; Bommert, K.; Mapara, M. Y.; Arnold, W.; Royer, H. D.; Grinstein, E.; Greiner, A.; Scheidereit, C. and Dorken, B. (1997): Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells, *J Clin Invest* (vol. 100), No. 12, pp. 2961-9.
- [44] Poppema, S.; Potters, M.; Emmens, R.; Visser, L. and van den Berg, A. (1999): Immune reactions in classical Hodgkin's lymphoma, *Semin Hematol* (vol. 36), No. 3, pp. 253-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10462325
- [45] Jundt, F.; Anagnostopoulos, I.; Bommert, K.; Emmerich, F.; Muller, G.; Foss, H.D.; Royer, H.D.; Stein, H. and Dorken, B. (1999): Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils., *Blood* (vol. 94), No. 6, pp. 2065-71. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.10477736>
- [46] Krappmann, D.; Emmerich, F.; Kordes, U.; Scharschmidt, E.; Dorken, B. and Scheidereit, C. (1999): Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *Oncogene* (vol. 18), No. 4, pp. 943-53.

- [47] Emmerich, F.; Meiser, M.; Hummel, M.; Demel, G.; Foss, H. D.; Jundt, F.; Mathas, S.; Krappmann, D.; Scheidereit, C.; Stein, H. and Dorken, B. (1999): Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells, *Blood* (vol. 94), No. 9, pp. 3129-34.
- [48] Cabannes, E.; Khan, G.; Aillet, F.; Jarrett, R. F. and Hay, R. T. (1999): Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpa, *Oncogene* (vol. 18), No. 20, pp. 3063-70.
- [49] Jungnickel, B.; Staratschek-Jox, A.; Brauninger, A.; Spieker, T.; Wolf, J.; Diehl, V.; Hansmann, M. L.; Rajewsky, K. and Kuppers, R. (2000): Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpa gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma, *J Exp Med* (vol. 191), No. 2, pp. 395-402.
- [50] Kanzler, H.; Hansmann, M. L.; Kapp, U.; Wolf, J.; Diehl, V.; Rajewsky, K. and Kuppers, R. (1996): Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient, *Blood* (vol. 87), No. 8, pp. 3429-36.
- [51] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2 edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- [52] Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal Biochem* (vol. 132), No. 1, pp. 6-13.
- [53] Lichter, P.; Cremer, T.; Borden, J.; Manuelidis, L. and Ward, D. C. (1988): Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries, *Hum Genet* (vol. 80), No. 3, pp. 224-34.
- [54] Rigby, P. W.; Dieckmann, M.; Rhodes, C. and Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I, *J Mol Biol* (vol. 113), No. 1, pp. 237-51.
- [55] Falini, B.; Flenghi, L.; Fedeli, L.; Broe, M. K.; Bonino, C.; Stein, H.; Durkop, H.; Bigerna, B.; Barbabietola, G.; Venturi, S. and et al. (1992): In vivo targeting of Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with monoclonal antibody Ber-H2 (CD30): immunohistological evidence, *Br J Haematol* (vol. 82), No. 1, pp. 38-45.

- [56] Schug, J. and Overton, G. C. (1997): Modeling transcription factor binding sites with Gibbs Sampling and Minimum Description Length encoding, *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* (vol. 5), pp. 268-71.
- [57] Jundt, F.; Kley, K.; Anagnostopoulos, I.; Schulze Probsting, K.; Greiner, A.; Mathas, S.; Scheidereit, C.; Wirth, T.; Stein, H. and Dorken, B. (2002): Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease, *Blood* (vol. 99), No. 8, pp. 3060-2.
- [58] Allman, D.; Punt, J. A.; Izon, D. J.; Aster, J. C. and Pear, W. S. (2002): An invitation to T and more: notch signaling in lymphopoiesis, *Cell* (vol. 109), No. Suppl, pp. S1-11.
- [59] Amit, S. and Ben-Neriah, Y. (2003): NF-kappaB activation in cancer: a challenge for ubiquitination- and proteasome-based therapeutic approach, *Semin Cancer Biol* (vol. 13), No. 1, pp. 15-28.
- [60] Joos, S.; Granzow, M.; Holtgreve-Grez, H.; Siebert, R.; Harder, L.; Martin-Subero, J. I.; Wolf, J.; Adamowicz, M.; Barth, T. F.; Lichter, P. and Jauch, A. (2003): Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2, *Int J Cancer* (vol. 103), No. 4, pp. 489-95.
- [61] He, Z.; Xin, B.; Yang, X.; Chan, C. and Cao, L. (2000): Nuclear factor-kappaB activation is involved in LMP1-mediated transformation and tumorigenesis of rat-1 fibroblasts, *Cancer Res* (vol. 60), No. 7, pp. 1845-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10766170>
- [62] Simeonidis, S.; Stauber, D.; Chen, G.; Hendrickson, W. A. and Thanos, D. (1999): Mechanisms by which IkappaB proteins control NF-kappaB activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 96), No. 1, pp. 49-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9874770>
- [63] Mathas, S.; Hinz, M.; Anagnostopoulos, I.; Krappmann, D.; Lietz, A.; Jundt, F.; Bommert, K.; Mehta_Grigoriou, F.; Stein, H.; Dorken, B. and Scheidereit, C. (2002): Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B., *The Embo Journal* (vol. 21), No. 15, pp. 4104-13. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.12145210>

- [64] Watanabe, M.; Ogawa, Y.; Ito, K.; Higashihara, M.; Kadin, M. E.; Abraham, L. J.; Watanabe, T. and Horie, R. (2003): AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Am J Pathol* (vol. 163), No. 2, pp. 633-41.
- [65] Le Bail, O.; Schmidt-Ullrich, R. and Israel, A. (1993): Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family, *Embo J* (vol. 12), No. 13, pp. 5043-9.
- [66] Mungall, A. J.; et al. , Rogers, J. and Beck, S. (2003): The DNA sequence and analysis of human chromosome 6, *Nature* (vol. 425), No. 6960, pp. 805-11.
- [67] Akasaka, T.; Miura, I.; Takahashi, N.; Akasaka, H.; Yonetani, N.; Ohno, H.; Fukuhara, S. and Okuma, M. (1997): A recurring translocation, t(3;6)(q27;p21), in non-Hodgkin's lymphoma results in replacement of the 5' regulatory region of BCL6 with a novel H4 histone gene, *Cancer Res* (vol. 57), No. 1, pp. 7-12.
- [68] Chen, Z.; Issa, B.; Brothman, L. J.; Hendricksen, M.; Button, D. and Brothman, A. R. (2000): Nonrandom rearrangements of 6p in malignant hematological disorders, *Cancer Genet Cytogenet* (vol. 121), No. 1, pp. 22-5.
- [69] Bergsagel, P. L. and Kuehl, W. M. (2001): Chromosome translocations in multiple myeloma, *Oncogene* (vol. 20), No. 40, pp. 5611-22.
- [70] Inoue, M.; Marx, A.; Zettl, A.; Strobel, P.; Muller_Hermelink, H.K. and Starostik, P. (2002): Chromosome 6 suffers frequent and multiple aberrations in thymoma., *American Journal of Pathology* (vol. 161), No. 4, pp. 1507-13. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.12368223>
- [71] Kurata, M.; Maesako, Y.; Ueda, C.; Nishikori, M.; Akasaka, T.; Uchiyama, T. and Ohno, H. (2002): Characterization of t(3;6)(q27;p21) breakpoints in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and construction of the histone H4/BCL6 fusion gene, leading to altered expression of Bcl-6., *Cancer Research* (vol. 62), No. 21, pp. 6224-30. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.12414651>

- [72] Seidl, S.; Kaufmann, H. and Drach, J. (2003): New insights into the pathophysiology of multiple myeloma, *Lancet Oncol* (vol. 4), No. 9, pp. 557-64.
- [73] Sonoki, T.; Harder, L.; Horsman, D.E.; Karran, L.; Taniguchi, I.; Willis, T.G.; Gesk, S.; Steinemann, D.; Zucca, E.; Schlegelberger, B.; Sole, F.; Mungall, A.J.; Gascoyne, R.D.; Siebert, R. and Dyer, M.J. (2001): Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies., *Blood* (vol. 98), No. 9, pp. 2837-44. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.11675358>
- [74] Staratschek-Jox, A.; Thomas, R. K.; Zander, T.; Massoudi, N.; Kornacker, M.; Bullerdiek, J.; Fonatsch, C.; Diehl, V. and Wolf, J. (2001): Loss of heterozygosity in the Hodgkin-Reed Sternberg cell line L1236, *Br J Cancer* (vol. 84), No. 3, pp. 381-7.
- [75] Jimenez, P.; Canton, J.; Collado, A.; Cabrera, T.; Serrano, A.; Real, L.M.; Garcia, A.; Ruiz_Cabello, F. and Garrido, F. (1999): Chromosome loss is the most frequent mechanism contributing to HLA haplotype loss in human tumors., *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* (vol. 83), No. 1, pp. 91-7. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.10449614>
- [76] Jarrett, R. F. (2003): Risk factors for Hodgkin's lymphoma by EBV status and significance of detection of EBV genomes in serum of patients with EBV-associated Hodgkin's lymphoma, *Leuk Lymphoma* (vol. 44), No. Suppl 3, pp. S27-32.
- [77] Glaser, S. L.; Gulley, M. L.; Borowitz, M. J.; Craig, F. E.; Mann, R. B.; Stewart, S. L.; Shema, S. J. and Ambinder, R. F. (2004): Inter- and intra-observer reliability of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin lymphoma using histochemical procedures, *Leuk Lymphoma* (vol. 45), No. 3, pp. 489-97.
- [78] Zhuang, Y. and Weiner, A. M. (1986): A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation, *Cell* (vol. 46), No. 6, pp. 827-35.
- [79] Schaffner, C.; Idler, I.; Stilgenbauer, S.; Dohner, H. and Lichter, P. (2000): Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 6, pp. 2773-8.
- [80] Bromidge, T.; Lowe, C.; Prentice, A. and Johnson, S. (2000): p53 intronic point mutation, aberrant splicing and telomeric associations in a case of B-chronic lymphocytic leukaemia, *Br J Haematol* (vol. 111), No. 1, pp. 223-9.

- [81] Beg, A. A.; Sha, W. C.; Bronson, R. T.; Ghosh, S. and Baltimore, D. (1995): Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B, *Nature* (vol. 376), No. 6536, pp. 167-70.
- [82] Emmerich, F.; Theurich, S.; Hummel, M.; Haeffker, A.; Vry, M. S.; Dohner, K.; Bommert, K.; Stein, H. and Dorken, B. (2003): Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *J Pathol* (vol. 201), No. 3, pp. 413-20.
- [83] Hoffmann, A.; Levchenko, A.; Scott, M. L. and Baltimore, D. (2002): The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation, *Science* (vol. 298), No. 5596, pp. 1241-5.
- [84] Nelson, D. E.; Ihekweaba, A. E.; Elliott, M.; Johnson, J. R.; Gibney, C. A.; Foreman, B. E.; Nelson, G.; See, V.; Horton, C. A.; Spiller, D. G.; Edwards, S. W.; McDowell, H. P.; Unitt, J. F.; Sullivan, E.; Grimley, R.; Benson, N.; Broomhead, D.; Kell, D. B. and White, M. R. (2004): Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression, *Science* (vol. 306), No. 5696, pp. 704-8.
- [85] Goudeau, B.; Huetz, F.; Samson, S.; Di_Santo, J.P.; Cumano, A.; Beg, A.; Israel, A. and Memet, S. (2003): IkappaBalpha/IkappaBepsilon deficiency reveals that a critical NF-kappaB dosage is required for lymphocyte survival., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 100), No. 26, pp. 15800-5. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.14665694>

7 PUBLIKATIONSLISTE

1. Als Poster und im Abstract-Band bei der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2000:

Emmerich, Florian ; Theurich, Sebastian; Meiser, Martina; Hummel, Michael; Jundt, Franziska; Mathas, Stephan; Krappmann, Daniel; Scheidereit, Claus; Stein, Harald; Doerken et al., Mutations of I kappa B alpha and I kappa B epsilon in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, Onkologie, Volume 23, Issue Sonderheft 7, October 2000, Page 144.

2. Als Vortrag und im Abstract-Band beim Kongress der Amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie (ASH) 2001:

Emmerich, Florian ; Theurich, Sebastian ; Haeffker, Antje ; Vry, Magnus ; Bommert, Kurt; Scheidereit, Claus; Hummel, Michael; Stein, Harald; Doerken, Bernd, Inactivating I kappa B alpha and epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, Blood, Volume 98, Issue 11, Part 1, November 16, 2001, Page 306a.

3. Als Poster und im Abstract-Band beim Kongress der Amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie (ASH) 2000:

Emmerich, Florian ; Theurich, Sebastian ; Meiser, Martina ; Hummel, Michael; Jundt, Franziska ; Mathas, Stephan ; Krappmann, Daniel; Scheidereit, Claus; Stein, Harald; Dorken et al., Mutations of I kappa B alpha and I kappa B epsilon in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, Blood, Volume 96, Issue 11, Part 1, November 16, 2000, Page 725a.

4. Emmerich, F.[§]; Theurich, S.[§]; Hummel, M.; Haeffker, A.; Vry, M. S.; Dohner, K.; Bommert, K.; Stein, H. und Dorken, B. (2003): Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, J Pathol (Volume 201), Nr. 3, 413-20. ([§] contributed equally)

8 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. Bernd Dörken möchte ich nicht nur für das Überlassen des Themas herzlich danken, sondern ganz besonders für seine freundliche und immerwährende großzügige Unterstützung, die mir die Durchführung der Experimente erst ermöglicht hat. In vielen Diskussionen hat er mich immer wieder ermutigt und war mit seiner Art des wissenschaftlichen Arbeitens und seiner kritischen, klaren Gedankenführung ein Vorbild.

Herrn Professor Dr. med. Harald Stein und den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, Benjamin Franklin Klinikum der Charité, bin ich für die wunderbare kollegiale Arbeitsatmosphäre und die wertvolle technische und wissenschaftliche Hilfe, die niemals versiegte, sehr dankbar. Insbesondere hat mich dort Herr PD Dr. Michael Hummel mit Rat und Tat unterstützt und so manches Mal meine Energiereserven zum Durchhalten mobilisiert.

Allen Mitarbeitern des Labors (AG Dörken) am Max-Delbrück-Centrum danke ich für die gute und fruchtbare Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Hilfe bei den Tücken des Alltags.

Ebenso gebührt Frau Katja Borzym vom Berliner Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Dank für ihre Hilfe, mit der sie mich bei den Sequenzierungen der Gen-Datenbank unterstützt hat.

Frau PD Dr. Konstanze Döhner (Klinik für Innere Medizin III der Universität Ulm), die mit ihrer großen Erfahrung die FISH-Analysen durchgeführt hat, bin ich für die unkomplizierte Hilfe sehr dankbar.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mich während meines bisherigen Lebensweges so kompromisslos unterstützt und mich mit ihrer Liebe und Geduld getragen hat. Nur durch sie bin ich überhaupt so weit gekommen. Meinen lieben Freunden danke ich dafür, dass sie für mich auch während des teilweise eremitischen Existierens da waren und mich immer wieder „auf den Boden gestellt haben“.

9 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Sebastian Theurich

Wichertstr. 57

10439 Berlin

Geboren am 9. April 1976 in Haan

SCHULBILDUNG

1982 – 1986

Städtische Grundschule Haan

1986 – 1992

Evangel. D.- Bonhoeffer- Gymnasium Hilden

1992 – 1995

Städt. Clara- Schumann- Gymnasium Bonn

1995 Juni

Abitur

HOCHSCHULSTUDIUM

1996 Oktober – 1999 April

Medizinische Universität zu Lübeck

1999 März

Physikum

1999 April – 2004 Juni

Humboldt Universität zu Berlin

2001 März

Erstes Staatsexamen

2003 März

Zweites Staatsexamen

2004

Drittes Staatsexamen

PRAKTISCHES JAHR

2003 April (1. Tertial)

Medizinische Klinik m.S. Hämatologie und
Onkologie der Charité - Campus Virchow
(Prof. Dr.med. B. Dörken)

2003 August (2. Tertial)

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der
Charité - Campus Virchow
(Prof. Dr. Konrad Falke)

2003 Dezember (3. Tertial)

Chirurgische Klinik am Kantonalen Spital Grabs,
Schweiz
(CA Dr. A. Mebold)

BERUFSTÄTIGKEIT

Seit September 2004

AiP und Assistenzarzt an der Charité - Medizinische
Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie/ Onkologie
(Prof. Dr.med. B. Dörken)

STIPENDIEN

Seit 1996

Stipendiat des Evangelischen Studienwerks Villigst

2002

Erasmus-Stipendium für ein Auslandsstudium in
Schweden

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Untersuchungen zur Molekularpathologie des Hodgkin Lymphoms – Klonierung des I kappa B epsilon Gens und Mutationsanalyse in Einzelzellen“ ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das verwendete Schrifttum vollständig erwähnt habe, die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass die vorliegende Dissertationsschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Berlin, den 14. September 2005

S. Theurich